

BESTIMMUNGEN VON
ERYTHROZYTENVOLUMEN-VERTEILUNGSKURVEN
MIT EINEM ELEKTRONISCHEN MESSVERFAHREN:
NORMWERTBEREICHE UND VERÄNDERUNGEN BEI
HÄMATOLOGISCHEN UND NICHTHÄMATOLOGISCHEN
ERKRANKUNGEN

KARL JOACHIM STORCK

1970

BESTIMMUNGEN VON

ERYTHROZYTENVOLUMEN-VERTEILUNGSKURVEN

MIT EINEM ELEKTRONISCHEN MESSVERFAHREN:

NORMWERTBEREICHE UND VERÄNDERUNGEN BEI
HÄMATOLOGISCHEN UND NICHTHÄMATOLOGISCHEN

ERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

KARL JOACHIM STORCK

aus Pforzheim

Fachbereichsdekan:

Professor Dr. E. Straub

1. Gutachter:

Professor Dr. W. Prellwitz

2. Gutachter:

Professor Dr. P. Schölmerich

Tag der mündlichen Prüfung:

18. Januar 1978

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLCHEN 1 · RUF. 0 6132 / 57 11



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. METHODIK UND GERÄTE	4
1. DAS COULTER-PRINZIP	4
2. APPARATIVE ZÄHLUNG DER ERYTHROZYTEN	6
2.1 Arbeitsweise der Coulter Counter	6
2.2 Fehlerquellen bei der elektronischen Partikelzählung	7
2.2.1 Koinzidenz	7
2.2.2 Eigenschaften des Suspensionsmediums	7
2.2.3 Einfluß des Suspensionsmediums auf die Erythrozyten	7
2.2.4 Einfluß des elektrischen Stromes auf die Erythrozyten	7
2.2.5 Polarisationserscheinungen	8
3. APPARATIVE VOLUMENVERTEILUNGSKURVEN VON ERYTHROZYTEN	8
3.1 Prinzip der Gewinnung von Verteilungskurven; Channelyzer	8
3.2 Fehlerquellen bei der elektronischen Volumenbestimmung	10
3.2.1 Eigenschaften des Suspensionsmediums	10
3.2.2 Koinzidenz	12
3.2.3 Inhomogenität des elektrischen Feldes	13
3.2.4 Partikelformfaktor	17
3.2.5 Kapillarfaktor	18
3.2.6 Einfluß des elektrischen Stromes	
a) auf die Erythrozyten	19
b) auf das Suspensionsmedium	19
3.2.7 Einfluß des Suspensionsmediums auf die Erythrozyten	19
3.2.8 Polarisierung der Elektroden	20

4.	FORM DER ERYTHROZYTENVOLUMEN-VERTEILUNGSKURVEN	20
4.1	Form und Interpretation der Coulter'schen EEV-Verteilungskurven	20
4.2	Korrektur der Coulter'schen Verteilungs- kurven	22
5.	EICHUNG	23
5.1	Berechnung absoluter Partikelvolumina ohne Eichpartikel	23
5.2	Referenzeichung	24
6.	PROBENAUFBEREITUNG	26
7.	DIE VERWENDETEN GERÄTE UND IHRE EINSTELLUNGEN	27
7.1	Coulter Counter Modell F_N	27
7.2	Coulter Channelyzer II	28
7.3	Coulter Counter Modell S	29
8.	BESTIMMUNG VON PARAMETERN, WELCHE DIE VERTEILUNGS- KURVEN CHARAKTERISIEREN	29
8.1	Das MCV	29
8.2	Die Anisozytose	30
9.	KOLLEKTIV	33
10.	STATISTISCHE BERECHNUNG	34
III.	ERGEBNISSE	37
1.	NORMWERTE	37
2.	HÄMATOLOGISCHE ERKRANKUNGEN	43
2.1	M. Hodgkin	43
2.2	Chronisch myeloische Leukämie (CML)	43

3. LEBERERKRANKUNGEN 46

3.1 Hepatitis 46

3.2 Lebercirrhose 46

IV. DISKUSSION 49

1. NORMWERTE UND ERFASSUNG VON NORMWERTBEREICHEN 49

1.1 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren 49

1.1.1 MCV 49

1.1.2 Alters- und Geschlechtsbeziehungen 51

1.1.3 Anisozytose 52

1.2 Normwertbereiche 53

2. HÄMATOLOGISCHE ERKRANKUNGEN 55

2.1 M. Hodgkin 55

2.2 Chronisch myeloische Leukämie (CML) 56

2.3 Bedeutung der relativen Anisozytose (An_{rel}) und Mischverteilungen 57

3. LEBERERKRANKUNGEN 61

3.1 Hepatitis 61

3.2 Lebercirrhose 61

4. ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDE DER EINZELNEN KRANKHEITSGRUPPEN IN IHRER GESAMTHEIT GEGENÜBER DEM NORMWERTKOLLEKTIV UND UNTEREINANDER IM HINBLICK AUF STATISTISCHE SIGNIFIKANZ 63

V. ZUSAMMENFASSUNG 65

VI. LITERATURVERZEICHNIS 67

I. EINLEITUNG

Bei der Diagnose und Differentialdiagnose hämatologischer und nicht hämatologischer Erkrankungen spielen neben den grundlegenden Parametern, wie die Anzahl der Erythrozyten/ μl , die Hämoglobinkonzentration/100 ml Blut und der Hämatokrit in Vol %, außerdem noch folgende Meßgrößen eine Rolle:

- a) das MCV, d.h. das mittlere Zellvolumen des Erythrozyten.

Dieser Wert wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MCV} \left[\mu\text{m}^3 \right] = \frac{\text{Hkt} \cdot 10}{\text{Erythrozyten}/\mu\text{l} \cdot 10^{-6}}$$

- b) das Hb_E oder der durchschnittliche Hämoglobingehalt der Erythrozyten:

$$\text{Hb}_E \left[\text{pg} = 10^{-12} \text{g} \right] = \frac{\text{Hb} [\text{g}\%] \cdot 10}{\text{Erythrozyten}/\mu\text{l} \cdot 10^{-6}}$$

- c) das MCHC oder die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration des Einzelerythrozyten:

$$\text{MCHC} [\text{g}\%] = \frac{\text{Hb} [\text{g}\%] \cdot 100}{\text{Hkt}}$$

Im allgemeinen wird das mittlere Zellvolumen aus Hämatokrit und der Anzahl der Erythrozyten berechnet und nicht gemessen. Dabei enthält dieser Wert die methodischen Fehler beider Methoden. Die Kammerzählung der Erythrozyten ist nach der Literatur (v. Boroviczéni, 3) mit einem relativen Variationskoeffizienten von 4,5 - 5,8 %, die Hämatokritbestimmung mit einer methodischen Variationsbreite von 2 - 5 % behaftet. Somit liegt dann die relative Schwankungsbreite der Berechnung des mittleren Zellvolumens bei durchschnittlich 10 %.

Aus der Möglichkeit, die Größe und Form der Erythrozyten mikroskopisch im fixierten Ausstrichpräparat zu beurteilen, sind verschiedene Verfahren entwickelt worden. Ein grundsätzliches Problem entsteht hierbei aus der Frage, inwieweit die Herstellung der Präparate die morphologischen Eigenschaften der Blutkörperchen beeinflusst.

Von Price-Jones (30, 31) wurden Verfahren über die Verteilungskurven der Erythrozyten-

größe erarbeitet. In einem gefärbten Ausstrichpräparat wird bei einer bestimmten Zahl (500) von Erythrozyten der größte und kleinste Durchmesser der beiden Seitenflächen ermittelt und daraus jeweils der arithmetische Mittelwert berechnet. Die erhaltenen Werte trägt man anschließend nach ihrer Häufigkeit in ein Diagramm ein. Die Schwäche dieser Methode liegt einmal in ihrem Zeitaufwand, und außerdem darin, daß die Erythrozyten normalerweise deutliche Abweichungen von einer Kreisfläche zeigen (Lieberherr, 24).

Um letzterem mehr Rechnung zu tragen, setzte Günther (15, 16, 17) als Grundlage der Beurteilung anstelle der Kreisfläche die Ellipsenfläche. Als große und kleine Achsen benützte er die beiden nach Price-Jones gemessenen Durchmesser der Erythrozyten und berechnete die numerische Exzentrizität nach der Gleichung

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2},$$

wobei a und b der Hälfte dieser Durchmesser entsprechen. Man erhält so einen Wert zwischen 0 und 1; je mehr er sich 1 nähert, also a wesentlich größer als b wird, desto schmaler wird die Ellipse. Umgekehrt liegt, wenn der Wert 0 ist bzw. a und b gleich sind, die Kreisform vor.

Dieses Verfahren fand keinen nachhaltigen Anklang, da der beträchtliche rechnerische Aufwand in keinem Verhältnis zu einer den wahren Verhältnissen nahe kommenden Charakterisierung der Gestalt der roten Blutzellen stand.

Zur Vereinfachung führte Hernberg (19) den "Poikilozytosegrad" ein. Hierzu subtrahierte er bei einer größeren Erythrozytenzahl die beiden "Price-Jones'schen Durchmesser" voneinander und bestimmte den arithmetischen Mittelwert der Unterschiede, dem er dann die obige Bezeichnung zuordnete. Von Reimann und Strancali (32) wurde später eine Änderung vorgenommen, indem sie bei der Berechnung den größten Längendurchmesser und den auf diesem senkrecht stehenden "Breitendurchmesser" verwendeten und die somit gewonnene Zahl "Entrundungsgröße (E)" nannten.

Obwohl mit den aufgeführten verschiedenen Verfahren umfangreiche Untersuchungen durchgeführt wurden und brauchbare Ergebnisse über die morphologischen Verhältnisse bei normalen und pathologischen Blutproben vorliegen, finden heute in der Routine praktisch nur die Price-Jones-Kurven in größerem Ausmaße Anwendung. Im übrigen begnügt

man sich damit, einen Blutaussstrich bezüglich der Gestalt seiner Erythrozyten mit Bezeichnungen wie Anisozytose, Poikilozytose, Sphärozyten, Elliptozyten usw. näher zu charakterisieren.

Durch die enorme Zunahme von hämatologischen Untersuchungen wurden seit etwa 15 Jahren mechanisierte Analysengeräte erprobt, die es gestatten, aus EDTA-Blut Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobinkonzentrationen zu bestimmen. Hierbei haben Geräte, die nach einem von Coulter (9, 10) angegebenen Meßprinzip arbeiten, in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diese elektronischen Apparate ermöglichen es, die korpuskulären Bestandteile des Blutes mit hoher Meßgeschwindigkeit und Genauigkeit ihrer Zahl und dem Volumen nach zu registrieren. Ein anderer Vorteil ist darin zu sehen, daß die Messungen weitgehend frei von subjektiven Einflüssen sind. Da die Volumenbestimmung der Partikel einzeln erfolgt, ergibt sich die Möglichkeit der Aufnahme von Volumenverteilungskurven. Die aufwendige Erstellung von Price-Jones-Kurven kann dementsprechend ersetzt werden, zumal die Meinung vorherrscht, daß das Zellvolumen mehr diagnostische Information zu liefern vermag als der Zelldurchmesser (41). Zudem kommt beim elektronischen Verfahren eine viel größere Anzahl von Teilchen zur Berücksichtigung, woraus eine wesentlich genauer definierte Verteilung resultiert.

In praxi hat sich die Bestimmung von Erythrozytenvolumen-Verteilungskurven noch nicht durchsetzen können. In der vorliegenden Arbeit sollen die theoretischen Voraussetzungen für die Erythrozytenvolumenbestimmung mit elektronischen Partikelmeßzählgeräten dargestellt werden. Im praktischen Teil soll der Normbereich für beide Geschlechter ermittelt werden sowie an einigen Krankheitsgruppen die klinische Bedeutung der beschriebenen Untersuchungsmethode aufgezeigt werden.

II. METHODIK UND GERÄTE

1. DAS COULTER-PRINZIP

Das elektronische Verfahren nach Coulter (9, 10) basiert auf der unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeit einer Elektrolytlösung und der darin suspendierten Partikel. Zwei eingetauchte Elektroden (E_1 und E_2) haben nur durch eine kleine, genau dimensionierte Kapillaröffnung (K) über das leitfähige Medium Verbindung. Legt man eine Spannung (U) an, so fließt gemäß dem Ohmschen Gesetz ein Strom (I), dessen Stärke dem Widerstand (R) der Elektrolytlösung umgekehrt proportional ist ($I = \frac{U}{R}$). Tritt ein Teilchen, welches nichtleitend ist oder eine nichtleitende Membran besitzt, durch das Loch hindurch, so entsteht eine kurze Widerstandserhöhung (ΔR). Unter der Voraussetzung, daß die Partikel gegenüber den geometrischen Abmessungen der Kapillaröffnung klein sind, findet man Widerstandsänderungen, welche dem Volumen der Teilchen nahezu proportional sind.

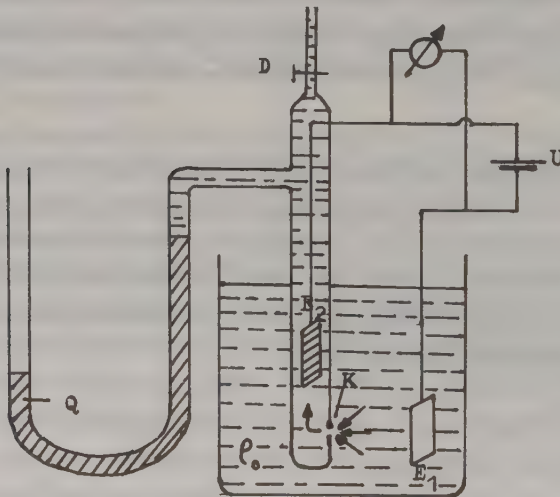


Abb. 1: Schema zum Coulter-Prinzip

Für ΔR wurde bei Vorliegen eines homogenen elektrischen Feldes innerhalb der Bohröffnung folgende Gleichung angegeben:

$$\Delta R = \frac{\rho_e \cdot V}{F^2} \cdot \frac{1}{\frac{1}{1 - \frac{\rho_e}{\rho}} - \frac{f}{\varphi \cdot F}} \quad (\text{Gl. 1})$$

ρ_e = spez. Widerstand der Elektrolytlösung [$\Omega \cdot \text{cm}$]

ρ = effektiver spez. Widerstand des Teilchens

V = Teilchenvolumen [μm^3]

F = Kapillarquerschnitt senkrecht zur Kapillarachse [μm^2]

f = Querschnitt des Teilchens senkrecht zur Kapillarachse

φ = $\frac{\text{Teilchenabmessung parallel zur Kapillarachse}}{\text{Durchmesser einer Kugel gleichen Volumens}}$

Bei der Betrachtung von Blutzellen spielt der zweite Teil der rechten Gleichungsseite eine unbedeutende Rolle. Das Verhältnis $\frac{\rho_e}{\rho}$ kann gegen 1 vernachlässigt werden; außerdem wird bei den verwendeten Kapillaren $\frac{f}{F}$ sehr klein. Somit resultiert die oben beschriebene Beziehung $\Delta R \sim V$.

Diese Beziehung hat sich inzwischen nach eingehenden Untersuchungen als unzulänglich erwiesen. Zur Darstellung der genauen Beziehung zwischen ΔR und dem Partikelvolumen V müssen folgende Einflüsse berücksichtigt werden: Partikelform (in der Formel 1 nur unzureichend berücksichtigt), Kapillarlänge und Feldinhomogenitäten.

Die beim Durchtritt eines Teilchens hervorgerufenen Widerstandsänderungen werden als Spannungsimpulse registriert, wobei die Höhe dieser Impulse als Maß für das Volumen dient. Der Strom des Suspensionsmediums und darin befindlicher Partikel durch das Meßloch wird durch Erzeugung eines Unterdrucks auf der einen Seite der Öffnung bewirkt. Will man eine Aussage über die Partikelkonzentration erhalten, sorgt man dafür, daß bei jedem Meßvorgang - z.B. mittels eines Quecksilbemanometers - eine gleichbleibende Suspensionsmenge durch die Kapillare gesaugt wird.

2. APPARATIVE ZÄHLUNG DER ERYTHROZYTEN

2.1 Arbeitsweise der Coulter Counter

Die in den letzten 15 Jahren auf den Markt gekommenen "Coulter"-Modelle arbeiten alle nach dem Coulter'schen Prinzip, wobei die Verfeinerung der Anwendung im Vordergrund der Bemühungen stand und auch noch steht, was sich in der laufenden Verbesserung der Elektronik und in der Ausschaltung von Fehlerquellen äußert. Die beim Durchfluß jeder einzelnen Partikel entstehenden Impulse werden verstärkt, auf dem Bildschirm einer Kathodenstrahlröhre sichtbar gemacht und durch Zählröhren festgehalten. Da die Apparatur qualitativ keine Unterscheidung treffen kann, muß dies bei der Zählung von Erythrozyten indirekt über ihre Größe, in diesem Falle also über das Volumen erfolgen. Dem dient ein Schwellenwertdiskriminator, mit dem man die Größengrenze der zu zählenden Partikel bestimmen kann. Nur solche Teilchen, die z.B. in den aus ihnen resultierenden Impulshöhen einen gewählten Schwellenwert (Threshold) überschreiten, werden gezählt. Dadurch kann die Mitberücksichtigung von Zelltrümmern und Verunreinigungen weitgehend ausgeschlossen werden. Da sich mit Ausnahme der Monozyten die zellulären Bestandteile des Blutes in ihrer physiologischen Volumenstreuung nicht überschneiden (35), ist nach Wahl einer geeigneten Schwellenwerteinstellung schon eine brauchbare Erythrozytenzählung möglich, da die hierbei noch miteingehenden Leukozyten wegen ihrer im Verhältnis zur Bestimmungsgröße unbedeutenden Anzahl vernachlässigt werden können. Bei anderen Coulter-Modellen sind beliebige Threshold-Einstellungen von beiden Seiten, also auch von "oben" her verwirklicht (Dual-Threshold-Counter), was bei der Analyse des weißen Blutbildes an besonderer Bedeutung gewinnt.

Einen wichtigen Faktor stellt die maximale reale Zählgeschwindigkeit dar, die durch das begrenzte Auflösungsvermögen des Gerätes bedingt ist; sie beträgt ca. 7000 Partikel/sec (33). Die zur Zählung verwandte Suspensionsmenge wird durch ein Quecksilbermanometer bestimmt. Innerhalb von 15 sec können bei einem Auflösungsvermögen von 7000 Partikeln/sec maximal 105 000 Teilchen registriert werden. Die größte Konzentration, die gerade noch meßbar ist, beträgt $2 \cdot 10^5$ Partikel/ml. Die Erythrozytenmenge im Blut ist im Durchschnitt bei gesunden männlichen Personen 5 Millionen/ μ l, auf 1 ml bezogen sind es $5 \cdot 10^9$. Hieraus folgt, daß die physiologische Erythrozytenkonzentration die maximale Meßkonzentration um das $2,5 \cdot 10^4$ fache übersteigt. Eine Blutprobe

muß also mindestens auf $1 : 25\,000$ verdünnt werden, damit überhaupt eine Messung vorgenommen werden kann. Es empfiehlt sich jedoch, zur Sicherheit eine noch etwas höhere Verdünnung heranzuziehen, da sich im Bereich der Grenzkonzentration das Phänomen der Koinzidenz, d.h. des gleichzeitigen Durchtritts von zwei oder mehreren Teilchen durch die Meßöffnung störend bemerkbar macht. Gewöhnlich wird Blut bei Erythrozytenzählungen deshalb auf $1 : 50\,000$ verdünnt.

Die Vorteile dieser Coulter-Geräte gegenüber den klassischen Methoden sind in der hohen Meßgeschwindigkeit und Genauigkeit zu sehen. Der mittlere Fehler liegt unter $0,5\%$.

2.2 Fehlerquellen bei der elektronischen Partikelzählung

2.2.1 Koinzidenz

Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei oder noch mehr Partikel die Kapillaröffnung gleichzeitig passieren und nur als ein Impuls registriert werden, wird um so größer, je höher die Meßkonzentration ist. Als relevant tritt die Koinzidenz in Erscheinung, sobald die Teilchenzahl $2 \cdot 10^4/\text{ml}$ bzw. $1 \cdot 10^4/\text{Meßvolumen}$ überschreitet (33). Mit entsprechenden Tabellen, die jeweils für bestimmte Kapillaren gelten, muß der Koinzidenzfehler korrigiert werden; bei modernen Geräten übernimmt dies eine elektronische Korrektureinrichtung.

2.2.2 Eigenschaften des Suspensionsmediums

Die als Suspensionsmedium dienende Elektrolytlösung sollte weitgehend frei von Verunreinigungen sein. Kleinste Fremdpartikel können durch die SchwellenwertEinstellung gleichsam "ausgeblendet" werden. Durch eine Leerwertbestimmung kann der Grad einer derartigen Ergebnisverfälschung durch Verunreinigung ermittelt werden.

2.2.3 Einfluß des Suspensionsmediums auf die Erythrozyten

Dieser Gesichtspunkt spielt bei der Volumenbestimmung eine große Rolle.

2.2.4 Einfluß des elektrischen Stromes auf die Erythrozyten

Die Wirkung des Meßstromes auf Erythrozyten ist von indirekter Natur. Mögliche Schädigungen der roten Blutkörperchen werden durch das an der Anode entstehende elementare Chlor und durch die innerhalb der Kapillaröffnung erzeugte Wärme hervorgerufen (36).

Bei der verwendeten elektrischen Stromstärke und der relativ kurzen Meßdauer haben derartige Vorgänge aber keine Bedeutung.

2.2.5 Polarisationserscheinungen

Die infolge der elektrolytischen Polarisation auftretende Gegenspannung schwächt den Strom ab, so daß nach dem Ohmschen Gesetz ein zu hoher Widerstand resultiert. Aus diesem Grund wird der Stromkreis zwischen den einzelnen Zählungen jeweils umgepolt, damit sich keine stärkere Polarisation ausbilden kann. Besonders störend sind derartige Effekte bei der Volumenmessung.

3. APPARATIVE VOLUMENVERTEILUNGSKURVEN VON ERYTHROZYTEN

3.1 Prinzip der Gewinnung von Verteilungskurven; Channelyzer

Bei dem Coulter Counter ist der Schwellenwertknopf in 100 Bereiche eingeteilt, wobei eine lineare Beziehung zum Teilchenvolumen besteht, d.h. bei Verstellung des Threshold um 1 Skalenteil wird der Größenbereich der zu berücksichtigenden Impulse immer um eine konstante Stufe variiert. Somit ist es mit einem Zählgerät möglich, Volumenverteilungskurven zu erhalten. Dies geschieht indirekt über Differentiation einer Zählkurve, die durch Auftragen der Partikelzahl gegen verschiedene Blendeneinstellungen (Threshold = Schwelle) entsteht.

Abb. 2:

Integralkurve (I) und Differentialkurve (D) einer Erythrozytenzählung

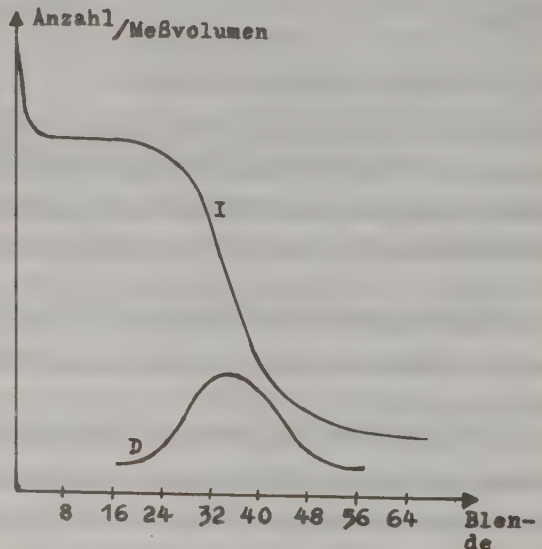


Abb. 2 zeigt schematisch den Verlauf einer Zählkurve bei Verwendung einer Elektrolytlösung mit aufgeschwemmten Erythrozyten. Diese Kurve kann man als Integralkurve bezeichnen. Der anfängliche steile Abfall bei den untersten Blendeneinstellungen ist auf den apparativ bedingten Untergrundsrauschpegel und eine eventuelle Verunreinigung des Elektrolyten verursacht. Auch Thrombozyten können an dieser Stelle eingehen.

Einen großen Fortschritt haben die Vielkanal-Impulshöhenregistriergeräte (Vielkanal-Impulshöhenanalysator, Channelyzer) gebracht. Hier werden die gemessenen Impulse gespeichert und sofort in Größenklassen eingeordnet. Ermöglicht wird dies durch zahlreiche Zählwerke, die in jedem Augenblick des Meßvorganges registrierfähig sind, wobei jeweils eines für einen bestimmten Impulshöhenbereich verantwortlich ist. Dies wird erreicht durch Anwendung der Zweischwellenwertbegrenzung. Ein auf diese Weise definierter Ausschnitt trägt Bezeichnungen wie z.B. "Fenster" ("Window"), "Klasse" oder "Kanal" ("Channel"). Nummeriert man nun die Kanäle gemäß den ihnen zugeordneten Impulshöhen aus, besteht eine Proportionalität zwischen Kanalnummer und Partikelvolumen.

Die Arbeitsweise der Vielkanal-Impulshöhenanalysiergeräte ist wesentlich schneller und genauer als das Verfahren mit Hilfe eines reinen Zählgerätes. Zur Erstellung einer Verteilungskurve (EEV-Verteilungskurve = Einzelerthrozytenvolumen-Verteilungskurve) werden je nach Meßdauer die Impulse von 50 000 - 200 000 Erythrozyten berücksichtigt, das bedeutet, ein einzelner Kanal enthält im Durchschnitt 1000 - 5000 Impulse. Die hohe Anzahl der Registrierungen wirkt sich vorteilhaft auf die statistisch zu ermittelnde Fehlerbreite aus.

Bei den Coulter'schen Channelyzer-Geräten sind gewöhnlich 100 Kanäle verwirklicht, jeder von einem Teilchen ausgehende Impuls wird auf einer Kathodenstrahlröhre mit Koordinateneinteilung sichtbar gemacht, so daß man das Entstehen einer Verteilungskurve laufend verfolgen kann. Nach Beendigung einer Messung wird die gespeicherte Kurve mit einem XY-Schreiber aufgezeichnet.

Für die Festlegung der Meßdauer stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Vorgabe einer konstanten Meßzeit oder eines bestimmten Meßvolumens:

Ein Ordinatenwert der Kurve bedeutet somit die Impuls- bzw. Teilchenzahl pro Meßzeit bzw. Meßvolumen und Kanal ($\frac{\text{Teilchenzahl}}{\text{Meßzeit bzw. Meßvolumen} \cdot \text{Kanal}}$). Die Höhe der Kurve

ist veränderlich, wobei ihre durch Integration berechnete Fläche von der Partikelkonzentration abhängt; es handelt sich um eine "absolute" Verteilungskurve (Ordinate $\longrightarrow$ absolute Häufigkeitsverteilung).

2. Abstoppen des Meßvorganges, sobald in irgendeinem Kanal eine bestimmte Teilchenzahl erreicht ist:

Ein solcher Kanal enthält immer das EEV-Kurvenmaximum der jeweiligen Messung. Ein Ordinatenwert wird hier in seinem Verhältnis zu diesem Maximum gekennzeichnet. Die Höhe der Kurve wird konstant gehalten, es liegt eine "relative" oder "prozentuale" Volumenverteilungskurve vor (Ordinate $\longrightarrow$ relative Häufigkeitsverteilung).

Eine Vielzahl von Fehlerquellen und Störeinflüssen können die mit einem Vielkanal-Impulshöhenregistriergerät aufgezeichneten Volumenverteilungskurven beeinträchtigen. In dem folgenden Abschnitt sollen einige von ihnen besprochen werden.

3.2 Fehlerquellen bei der elektronischen Volumenbestimmung

3.2.1 Eigenschaften des Suspensionsmediums

Die Widerstandsänderungen, die sich beim Durchtritt von Partikeln definierter Größe durch die Kapillaröffnung ergeben, können in einer vereinfachten Form folgendermaßen dargestellt werden:

$$\Delta R = \frac{\rho_o \cdot V}{F^2} \cdot x \quad (\text{Gl. 2})$$

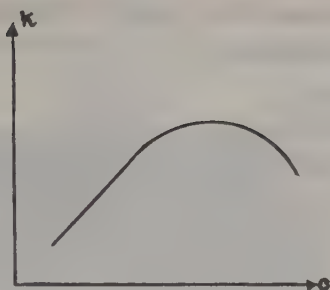
Eine direkte Beziehung besteht zwischen der Widerstandsänderung und dem spezifischen Widerstand der Elektrolytlösung. Der reziproke Wert des spez. Widerstands ist als spez. elektrische Leitfähigkeit κ ($\kappa [\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}] = \frac{1}{\rho_o [\Omega \text{ cm}]}$) definiert. Sie wird beeinflusst von

a) der Konzentration der Lösung:

Bei niedrigen Konzentrationen ist die Leitfähigkeit annähernd der Konzentration proportional ($\kappa \sim c$). Sie nimmt in dem Maße zu, wie sich die Anzahl der voneinander unabhängigen, frei beweglichen Ladungsträger erhöht. Mit steigender Konzentration verringert sich aber der Dissoziationsgrad, nach Durchlaufen eines Maximums nimmt κ bei hohen Konzentrationen wieder ab (s. Abb. 3).

Abb. 3:

Spez. Leitfähigkeit κ und Konzentration c



Ein von der Art der Elektrolytlösung unabhängiges Konzentrationsmaß ist die Ionenstärke, für welche bei genügender Verdünnung lediglich die Anzahl der Ionen und deren Ladungen maßgebend sind. Bei höheren Konzentrationen treten interionische Wechselwirkungen in den Vordergrund, die von den individuellen Ioneneigenschaften und von Strukturveränderungen des Lösungsmittels bestimmt werden.

In diesem Zusammenhang muß auch noch der Einfluß des pH erwähnt werden. Nach Untersuchungen von Ruhenstroth-Bauer und Zang (33) bleibt bei einer 0,9 %igen Kochsalzlösung, deren pH mittels $n/100$ NaOH bzw. $n/100$ HCl variiert wird, die Leitfähigkeit unter sonst gleichen Bedingungen zwischen pH 3 und pH 11 konstant.

b) der Temperatur:

Im Bereich von 17° bis 26°C findet sich praktisch eine lineare Beziehung zwischen Leitfähigkeit und Temperatur. Im Diagramm ist die Steigung der Geraden für jede Salzkonzentration charakteristisch. Bei einer physiologischen Kochsalzlösung beispielsweise beträgt die relative Widerstandsänderung rund $2\%/^{\circ}\text{C}$ (41).

Der Reinheitsgrad des Suspensionsmediums spielt eine gewisse Rolle, wenn Staubeilchen und andere Fremdpartikel, die zufällig im Größenbereich der Erythrozyten liegen, mit in die Verteilungskurve eingehen; derartige Effekte sind jedoch unbedeutend.

Im Gegensatz hierzu wirkt sich die teilweise Verstopfung der Kapillaröffnung einschneidend aus. Der Querschnitt der Meßöffnung senkrecht zur Strömungsrichtung wird hierbei in unterschiedlichem Ausmaße verringert. Bei konstantem Partikelvolumen führen solche Flächenverminderungen deshalb zu einer beträchtlichen Steigerung der bewirkten Wider-

standsänderungen. Abb. 4 zeigt die Verfälschung einer EEV-Verteilungskurve infolge Kapillarverstopfung.

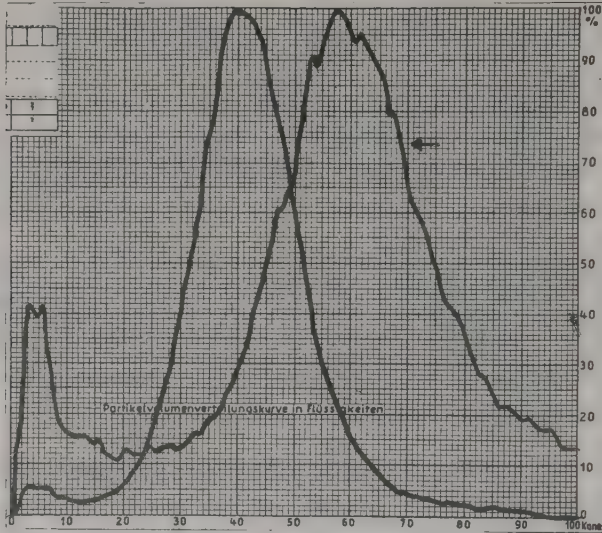


Abb. 4: Verfälschung einer EEV-Verteilungskurve infolge Kapillarverstopfung (←—)

3.2.2 Koinzidenz

Die Koinzidenz ist eine der Ursachen für die Rechtsschiefe der EEV-Verteilungskurven. Mehrere gleichzeitig im kritischen Bereich der Kapillare befindliche Partikel werden als 1 großes Teilchen gewertet. Abb. 5 demonstriert die unterschiedliche Höhe der vom Gerät letztlich registrierten Widerstandsänderungen in Abhängigkeit zum Abstand, in dem zwei Partikel die Meßöffnung durchqueren. Dies wird an Hand von nativen Erythrozyten und Latexteilchen gezeigt. Beide sollen - in der Form zwar verschieden - das gleiche Volumen besitzen. Die durch Erythrozyten und Latexpartikel ausgelösten Impulse haben eine unterschiedliche Wertigkeit. Diese unterschiedliche Bewertung erfolgt sowohl bei Einzelteilchen als auch beim Doppeldurchtritt der genannten Teilchen. Die Ursache für dieses Phänomen ist der sogenannten Formfaktor, der weiter unten (II.3.2.4) abgehandelt wird.

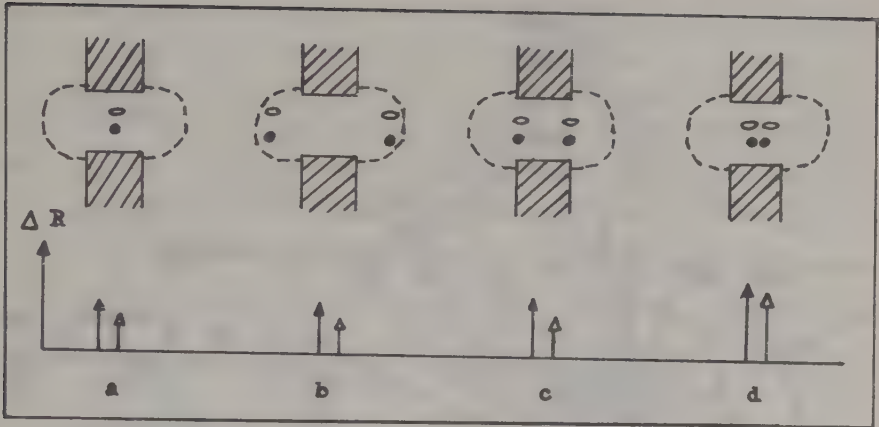


Abb. 5: Schema des kritischen Volumens und der Widerstandsänderungen ΔR , wie sie sich in ihrer Größe bei der Kapillarpassage der Partikel in unterschiedlichem Abstand zueinander ergeben

- ↑ Erythrocyten
- ↑ Latexpartikel und zugehöriges ΔR

3.2.3 Inhomogenität des elektrischen Feldes

Die verwendeten Kapillaren haben zylinderförmige Meßöffnungen. Die Feldverteilung in ihnen ist inhomogen, somit ergibt sich eine Abhängigkeit der Höhe der registrierten Impulse vom Ort, an dem sich eine Testpartikel jeweils befindet. Um diese Veränderungen quantitativ zu erfassen, müssen die Zusammenhänge mit konstanten Teilchenvolumen untersucht werden. Hierbei zeigt sich, daß zwischen den registrierten Widerstandsänderungen und der Stromdichte am Ort der Partikel eine gewisse Beziehung existiert.

Abb. 6 zeigt schematisch die entsprechenden Verhältnisse am Beispiel einer $80\text{ }\mu\text{m}$ langen Coulter-Kapillare mit einem Durchmesser von $100\text{ }\mu\text{m}$, wie sie durch Untersuchungen von Kachel (21, 22) und Thom (35) am vergrößerten Modell aufgeklärt werden konnten.

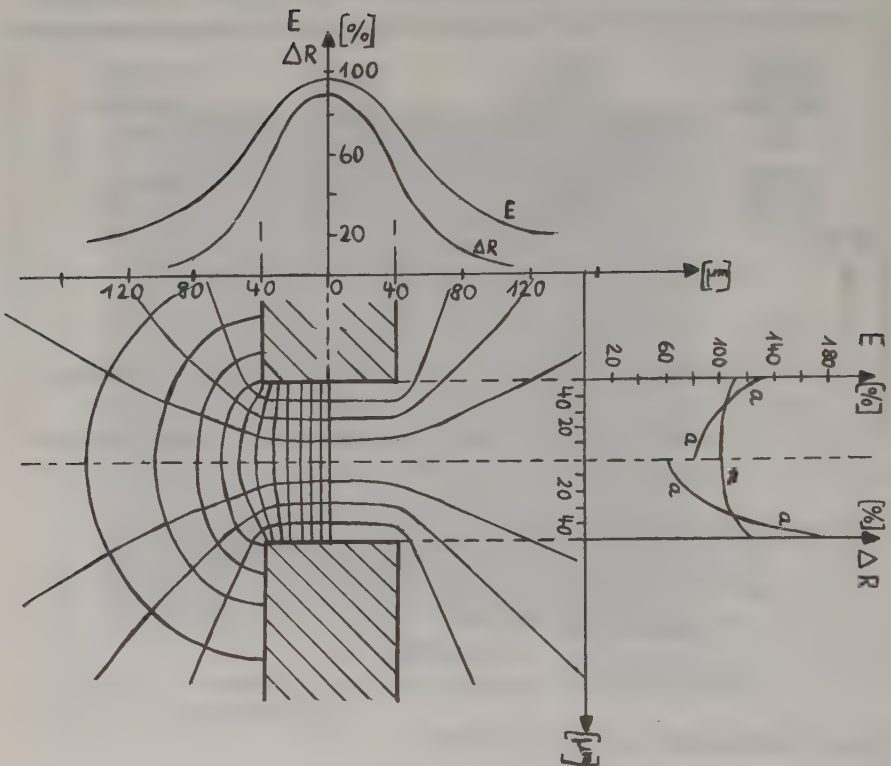


Abb. 6: Feldstärke und Widerstandsänderung
 oben: entlang der Lochachse
 rechts: quer zur Lochachse, a = in der Ein- bzw. Ausgangsebene,
 m = in der Meßlochmitte

Als nächstes soll auf die Bedeutung der Feldinhomogenität bei Coulter-Kapillaren im Hinblick auf die Erstellung von Volumenverteilungskurven eingegangen werden. Zur Veranschaulichung wird eine Probe aus Teilchen mit gleichem Volumen angenommen. Die folgenden Ableitungen beziehen sich auf die Ergebnisse von Kachel (21). Die Zusammenhänge zeigt Abb. 7 und 8:

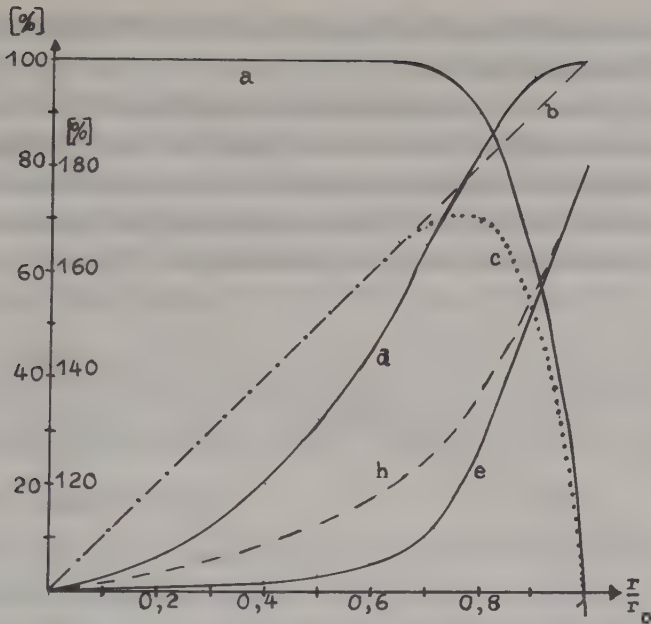


Abb. 7: Bedeutung der Partikelfehlbewertung bei Volumenverteilungskurven (r_0 = Meßlochradius)

Die Abszisse in Abb. 7 stellt das Verhältnis Bahnradius zu Meßlochradius dar.

- a) In Kurve a ist das Geschwindigkeitsprofil der laminaren Strömung dargestellt. Bedingt durch die Wandreibung geht der Wert bei Annäherung an den Lochrand gegen Null zurück. (Ordinate = Relativangaben zum Maximalwert)
- b) Kurve b entspricht der Zunahme des Umfanges in Abhängigkeit vom Radius. (Ordinate = Relativangaben zum Umfang am Lochrand)
- c) Aus a und b resultiert Kurve c, welche die effektive Durchtrittsmenge von Flüssigkeit und darin gleichmäßig suspendierter Partikel in Abhängigkeit vom Radius zeigt. (Ordinate = Relativangaben zum Randwert, der sich ergeben würde, wenn keine Wandreibung vorhanden wäre)
- d) Will man wissen, welche Strommenge durch einen Kanal mit einem bestimmten Radius fließt, so muß man alle Teilchen vom Radius Null an aufsummieren. Das geschieht durch Integration von c; wir erhalten auf diese Weise d. (Ordinate = Relativangaben zur effektiven Gesamtdurchflußmenge)

e) Kurve e zeigt nochmals die Impulsüberhöhung in ihrer radialen Abhängigkeit.
(Ordinate: 100 % $\triangleq$ axialer Bahnwert)

f) Man trägt nun zu jedem Wert der Summenkurve d die entsprechende Größe der Impulsüberhöhung aus e auf und findet die Summenkurve f (Abb. 8) der Durchtrittsmenge als Funktion der Impulsüberbewertung. Anders ausgedrückt kann man zur Erläuterung sagen: Bei einem Radius r, bei dem y % (= Ordinate) der gesamten Durchflußmenge erfaßt werden, beträgt die Impulsüberhöhung x % (= Abszisse für f).

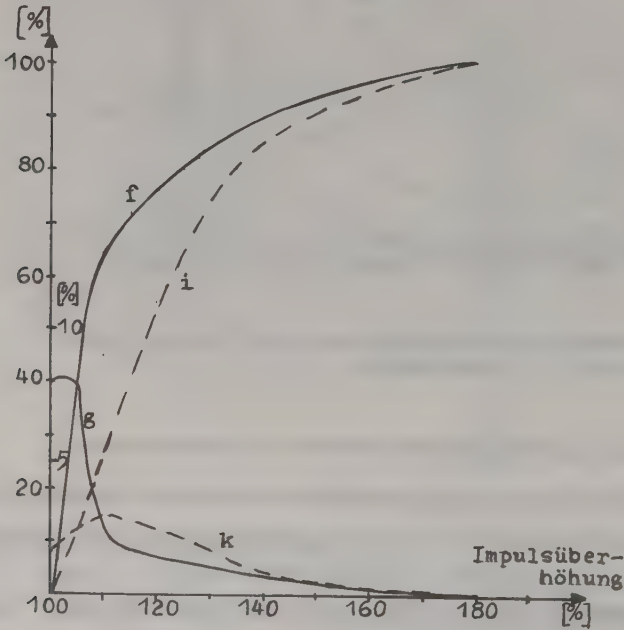


Abb. 8: Teilchendurchtrittsmenge als Funktion der Impulsüberhöhung
(Erklärung im Text)

g) Zuletzt wird noch f differenziert; es folgt die Kurve g, d.h. die prozentuale Durchflußmenge als Funktion der Impulsüberhöhung. Anders formuliert versteht sich der Sachverhalt besser: y % der Partikel werden mit x % bewertet. Dieses Histogramm stellt eine Verteilungskurve dar, die ja nach Dimension des Kapillarloches charakteristisch ist. Eigentlich müßte man eine bestimmte vertikale Ordinatenstrecke an der Stelle x = 100 %

erwarten, denn wir haben ja eine Probe von Teilchen gleichen Volumens vorausgesetzt, aber die inhomogene Feldverteilung führt zu der artefiziellen unterschiedlichen Bewertung, die von der Partikeldurchtrittsbahn abhängig ist.

h) Untersucht man Kapillaren mit kürzeren Meßlöchern, dann stellt sich eine andere Feldlinienstruktur (evtl. auch ein anderes Strömungsprofil) ein. Die Impulsüberhöhungskurve würde etwa in Richtung der in h (Abb. 7) dargestellten Form von e abweichen. Die entsprechende Summenkurve als Funktion der Überbewertung und die daraus abgeleitete Differentialkurve sind in Abb. 8 als i bzw. k skizziert (21).

Eine allgemeine Verteilungskurve streuender Partikel (z.B. EEV-Verteilungskurven) kann man sich aus einer Vielzahl nicht streuender Proben zusammengesetzt denken; andersherum gesehen gelangt man durch Addition dieser Einzelverteilungen zur Gesamtverteilung.

3.2.4 Partikelformfaktor

Der Partikelformfaktor wird mittels einer dimensionslosen Zahl beschrieben, welche man am besten als das Verhältnis zwischen dem im homogenen elektrischen Feld apparativ gemessenen Volumen und dem wahren Volumen eines Teilchens versteht. Um die Widerstandsänderung im Hinblick auf das reelle Volumen einer Partikel richtig interpretieren zu können, müssen die Gestalt und die Orientierung des Teilchens zum elektrischen Feld während der Kapillarpassage bekannt sein. Diese beiden Parameter sind im Formfaktor repräsentiert. Je nach Lage des Körpers in bezug auf die elektrische Feldrichtung schwankt dieser Wert zwischen zwei Extremgrößen. Hat das zu messende Teilchen Kugelform, sind beide Extremgrößen gleich groß, während bei langgezogenen Partikeln diese Werte erheblich auseinanderliegen können. Ein scheibchenförmiger Erythrozyt, der in der Mitte leicht eingedellt ist, besitzt, wenn er längs zu den Feldlinien ausgerichtet ist, einen Formfaktor von ca. 1,2, bei Querlage einen von 2,9 (35). Das Verhältnis des größeren Wertes zum kleineren wird auch als Lagefaktor bezeichnet. Bei einer Kugel ist der Formfaktor von der Lage unabhängig und beträgt 1,5.

Native Erythrozyten sind leicht verformbar. Bei der Durchwanderung des Meßloches kommt es zu Veränderungen der Gestalt, die bekannt sein müssen, um den unter diesen Bedingungen gültigen Formfaktor anwenden zu können. Die Durchströmungsgeschwindigkeit in der Meßöffnung kann Werte bis 10 m/sec erreichen, das bedeutet, daß Partikel beim Einlauf einer Beschleunigung in der Größenordnung von $10^4 g$ ($g = 9,81 \frac{m}{sec^2}$) =

mittlere Fallbeschleunigung auf der Erdoberfläche) ausgesetzt sind. Mittels einer Kurzzeitfotographieeinrichtung mit Belichtungszeiten im Nanosekundenbereich konnte Kachel (21) nachweisen, daß die Erythrozyten schon in gewisser Entfernung vor dem Meßloch ausgerichtet werden, so daß ihre Rotationssymmetrieachse senkrecht zur Strömung steht. In dieser Lage verformen sie sich unter dem Einfluß der Beschleunigung kurz vor Eintritt in die Kapillaröffnung in einen langgestreckten, angenähert rotationsellipsoidförmigen Körper, wodurch sich der Formfaktor auf ≈ 1 reduziert. Verläuft die Partikelbahn am Rande des Meßlochs, erfolgt keine einheitliche Ausrichtung der Erythrozyten mehr. Da dort große Strömungsgeschwindigkeitsunterschiede vorherrschen, können sich Partikel auch drehen, was bei nicht kugelförmigen Teilchen zu Formfaktoränderungen führt. Solche Ereignisse sind im Impulsbild am Auftreten von differierenden dritten Gipfeln zu erkennen. Der Saugunterdruck, die Kapillardimensionen und die Flüssigkeitsviskosität beeinflussen die auftretende Beschleunigung und die in der Kapillare erreichte Durchströmungsgeschwindigkeit.

Der Partikelformfaktor trägt zur Erklärung der Koinzidenzphänomene bei. Die in Abb. 5 a (S. 13) durch Pfeile angedeutete differente Bewertung der volumengleichen Partikel resultiert aus den unterschiedlichen Formfaktoren für native Erys ($\Phi_E \approx 1$) und Latexkügelchen ($\Phi_L = 1,5$) bei vergleichbarer Partikelbahn. In b sind die Teilchen jeweils noch zu weit auseinander, als daß sich eine koinzidenzbedingte Impulserhöhung ergeben könnte. Bei dem in c eingezeichneten Abstand findet sich gerade eine leichte Impulssteigerung durch den Doppeldurchtritt. Wenn die Partikel direkt hintereinander den Meßkanal (d) passieren (z.B. bei adhärennten Latexpartikeln ist diese Konstellation bevorzugt), ist die registrierte Impulsänderung bei den Erythrozyten annähernd doppelt so groß wie in a, da ja jetzt 2 Blutzellen an fast identischer Stelle und zum gleichen Zeitpunkt gemessen werden. Die Lage der beiden Latexpartikel direkt hintereinander reduziert jedoch den effektiven Formfaktor entscheidend, so daß die Impulshöhe weit unter dem doppelten Wert des entsprechenden Einzelobjektes zurückbleibt.

3.2.5 Kapillarfaktor

Selbst wenn bei den elektronischen Messungen die Partikelformfaktoren berücksichtigt werden, bleibt immer noch eine Abweichung vom tatsächlichen Volumen erhalten. Der Betrag ist für eine bestimmte Kapillare konstant und variiert je nach Abmessungen des Meßlochs. Bei einer 100 μm -Kapillare (70 μm lang) wurde nach Messungen mit unter-

schiedlichen Testpartikeln ein mittlerer Kapillarfaktor von 1,33 gefunden (26)¹. Bei Betrachtung aller durch den Querschnitt der Meßkanäle möglichen Teilchenbahnen sind diese Zusammenhänge komplizierter. Als Äquivalent für den Kapillarfaktor könnten hierbei in gewisser Hinsicht die in Abb. 8 dargestellten Differentialkurven dienen, jedoch bleiben unter diesem Gesichtspunkt Verschiebungen der Absolutwerte unrespektiert.

3.2.6 Einfluß des elektrischen Stromes

a) auf die Erythrozyten:

Nach Versuchen von Ruhenstroth-Bauer und Zang (33) kam es bei ununterbrochener Aufnahme von Verteilungskurven derselben Suspensionsprobe (0,9 %ige Kochsalzlösung) nach etwa 20 Minuten zu einer Schwellung der Erythrozyten, wobei nach 30 Minuten ein Maximum (140 % des Ausgangsvolumens) erreicht wurde. Nach 45 Minuten hatte das Volumen wieder ein wenig abgenommen und blieb dann für drei Stunden konstant. Auf der anderen Seite berichtet Wechselberger (41), daß schon nach 1 - 2 Minuten eine Rechtsverschiebung der Verteilungen von 0,5 - 1 Kanälen auftreten kann. Die Volumenzunahme ist nicht für alle Zellen gleich. Eigene Beobachtungen haben bei den meisten Erythrozytensuspensionen im elektrischen Feld keine sichtbaren Veränderungen erkennen lassen, allerdings waren die Proben niemals länger als 5 Minuten dem Meßstrom ausgesetzt. Bei den wenigen Fällen, wo leichte Verschiebungen des Verteilungsgipfels festzustellen waren, erwiesen diese sich als uneinheitlich.

b) auf das Suspensionsmedium:

Die Gefahr einer relevanten elektrolytischen Alteration der Suspension ist während der üblichen Meßdauer unter Einwirkung der aufgewendeten geringen Stromstärke nicht gegeben. Eine physiologische Kochsalzlösung bleibt sogar bis 20 Minuten bezüglich Temperatur, pH und Leitfähigkeit unverändert (33).

3.2.7 Einfluß des Suspensionsmediums auf die Erythrozyten

Die Bedingungen, welche eine Elektrolytlösung bieten muß, sollten möglichst wenig von denen des Humanplasmas abweichen. In erster Linie müssen in dieser Hinsicht die osmotischen Verhältnisse und der pH beachtet werden.

Hypotone und hypertone Lösungen führen zu den bekannten Schwellungs- bzw. Schrump-

¹ gemessen im Bereich der Meßlochachse

fungsprozessen, deren Ausmaß auch von der Art des Suspensionsmediums abhängt.

pH-Schwankungen in Nähe des physiologischen Bereichs verursachen annähernd lineare Volumenverschiebungen, zum Säuren hin soll das Volumen um wenige μm^3 zunehmen, umgekehrt bei einer Milieuänderung in Richtung zum Alkalischen (33, 7). Bei größeren pH-Abweichungen sind die Volumenänderungen nicht mehr linear.

Die Temperatur einer Elektrolytlösung beeinflusst die Größe der Erythrozyten nicht so stark. Immerhin kann jedoch in Gegend der Zimmertemperatur mit einer mittleren Volumenzunahme von ca. $\frac{1}{3} \mu\text{m}^3$ bei einer Temperaturerhöhung von 1°C gerechnet werden (33).

3.2.8 Polarisierung der Elektroden

Polarisationserscheinungen lassen sich vermeiden, wenn der Elektrolytstrom bei jedem Meßvorgang umgepolt wird. In diesem Fall muß darauf geachtet werden, daß der Verstärkerfaktor der Coulter-Elektronik um ca. 6 % differieren kann, wenn man die Messungen bei unterschiedlicher Stromrichtung vergleicht (41). Bei neueren Geräten berücksichtigt eine zusätzliche elektronische Einrichtung diese Abweichungen.

4. FORM DER ERYTHROZYTENVOLUMEN-VERTEILUNGSKURVEN

4.1 Form und Interpretation der Coulter'schen EEV-Verteilungskurven

Die mit einer Coulter-Kapillare aufgenommene Erythrozytenvolumen-Verteilungskurve einer normalen Blutprobe zeigt mit leichter Variationsmöglichkeit eine Form, wie sie in Abb. 9 c dargestellt ist. Auffällig ist der schiefe rechte Kurvenschenkel, welcher in den meisten Fällen auch leicht "gebuckelt" ("Kurvenschulter") erscheint. Als Ursache der Rechtsschiefe können in der Reihenfolge ihrer Bedeutung angeführt werden:

- a) die Inhomogenität des elektrischen Feldes innerhalb des Meßlochs
- b) Koinzidenz
- c) Formfaktoränderungen durch Drehung oder Taumeln der Erythrozyten im Wandbereich der Meßöffnung.

Bevor die unter a aufgeführten Phänome experimentell nachgewiesen waren, gab es die verschiedensten Interpretationen, welche die Rechtsschiefe erklären sollten. An dieser

Stelle seien kurz einige herausgegriffen.

Weed und Bowdler (42) betrachteten die rechte Flanke der EEV-Verteilungskurven als reell. Die Asymmetrie sei zurückzuführen auf den höheren osmotischen Druck in den kleineren Zellen, hervorgerufen durch deren Hämoglobin. Dies führe zu einer Verschiebung des linken Kurvenschenkels. Lushbaugh (25) begründete die Schiefe des Verteilungsspektrums mit zwei interferierenden normal verteilten Erythrozytenpopulationen. Andere Autoren (England 13, Jacobi 20, Brecher 4) nahmen eine lognormale Volumenverteilung an. Gutmann (18) erkannte zwar die artefizielle Natur des rechten Kurvenschenkels, konnte jedoch keine sichere Erklärung dafür finden. Die tatsächliche Ursache beruht jedoch auf der Feststellung, daß die Volumenverteilung des Normalblutes mit zunehmender Länge der Kapillare die Asymmetrie immer mehr verliert und annähernd die Gestalt einer Normalverteilung annimmt (6, 12, 36).

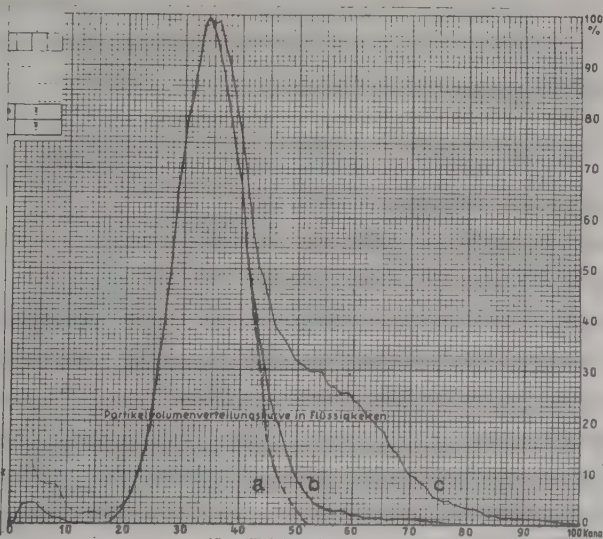


Abb. 9: Original-EEV-Verteilungskurve einer normalen Blutprobe:

- a) reelle Verteilungskurve
- b) mit Coulter-Kapillare mit Korrektur (Edit: ON)
- c) mit Coulter-Kapillare ohne Korrektur (Edit: OFF)
aufgenommen

Bei Coulter-Kapillaren mit kurzen Meßlöchern entspricht auch der linke Schenkel der registrierten Kurven nicht der wahren Verteilung. Der Kurvengipfel ergibt sich aus Messungen der Teilchen im Bereich der Durchtrittsbahnen, wo entsprechend dem Strömungsprofil die meisten Partikelpassagen erfolgen. Dies geschieht keinesfalls in Achsennähe, sondern weiter peripher (s. Abb. 7 c, S. 15). Für die Beurteilung des Teilchenvolumens ist die dort stattfindende Impulsüberhöhung maßgebend. Abb. 8 k (S. 16) zeigt die Häufigkeit der Durchtrittsmenge als Funktion zu dieser Impulsüberhöhung bei einer kürzeren Kapillare. Der Maßstab, welcher relativ für die meisten Partikel verantwortlich ist, und von dem auch das Kurvenmaximum abhängig ist, liegt schon im Bereich einer gewissen Überbewertung. Deshalb gibt es Teilchen, die im Verhältnis zu ihm unterbewertet werden. Dies bedingt eine leichte artefizielle Verbreiterung der linken Kurvenflanke der Gesamtverteilung, die man sich ja aus einer Vielzahl von Einzelverteilungen volumemäßig nicht streuender Partikel zusammengesetzt denken kann.

Im Gegensatz hierzu ist bei einer 100 μm -Kapillare die relative Unterbewertung so gering (Abb. 8 g), daß der linke Schenkel einer mit ihr aufgenommenen Verteilungskurve nahezu die tatsächlichen Verhältnisse wiedergibt.

4.2 Korrektur der Coulter'schen Verteilungskurven

Es stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung.

1. Man vermeidet die Meßfehler, indem man die Partikelsuspension nur das Zentrum der Meßöffnung durchströmen läßt. Thom und Mitarb. (35, 37) entwickelten die Zentralstrahlkapillare, bei der zwei getrennte Flüssigkeiten das Kapillarloch passieren. Die Teilchensuspension wird aus einer Düse angesaugt; ähnliches geschieht gleichzeitig mit einer partikelfreien Lösung aus dem die Düse umgebenden Raum, wodurch die zentral strömende Partikelsuspension ummantelt wird und bei coaxialer Zuordnung von Meßöffnung und Düse das Kapillarloch ausschließlich im Bereich der Öffnungsachse durchfließt.

Kachel (21) nutzte die natürliche strahlenförmige Konzentrierung des Strömungsfeldes vor dem Meßloch und die Zuordnung der Stromlinien vor und in der Meßöffnung aus. EEV-Verteilungskurven von Blutgesunden, die mit solchen Vorrichtungen aufgenommen werden, zeigen annähernd das Bild einer Gauß'schen Normalverteilung. Hierbei ist nur eine sehr geringe, visuell kaum erkennbare Schiefe des rechten Kurvenschenkels beobachtbar, die auf die größeren Retikulozyten zurückzuführen ist (36).

2. Korrektur mittels elektronischer Methoden:

An dieser Stelle sei das Impulsformerkennungsverfahren erwähnt. Es können zeitunabhängig mehrgipflige Impulse von eingipfligen unterschieden und die Amplituden von Maxima oder Minima der gewünschten Impulsart festgestellt werden. Auf diese Weise kann die Rechtsschiefe der Coulter-Kurven beträchtlich vermindert, jedoch nach dem derzeitigen technischen Stand noch nicht vollständig beseitigt werden. Benützt man ein Gerät, das über das Impulserkennungsverfahren Verteilungskurven erstellt, so kann man sich über den Grad der Korrektur informieren, wenn man die Flächenverhältnisse von der unkorrigierten bzw. elektronisch korrigierten Kurve zur Zentralstrahlkurve vergleicht. Bei vollständiger Korrektur würde dieses Flächenverhältnis den Wert 1,0 annehmen.

5. EICHUNG

5.1 Berechnung absoluter Partikelvolumen ohne Eichpartikel

Um eine sinnvolle elektrische Eichung zu erreichen, muß ein einheitlicher Bewertungsmaßstab angewendet werden. Am besten wird diese Voraussetzung bei Vermessung der Teilchen im Zentralstrahl erfüllt.

Die Gleichung 2 enthält alle relevanten Parameter der Coulter-Formel:

$$\Delta R = \frac{e_0 \cdot V}{F^2} \cdot x \quad (\text{Gl. 2})$$

Nach dem Teilchenvolumen aufgelöst erhält man

$$V = \frac{\Delta R \cdot F^2}{e_0} \cdot \frac{1}{x}$$

In der Gleichung sind Partikelformfaktor, Kapillardimensionen und Inhomogenitäten des elektrischen Feldes nicht bzw. unzureichend berücksichtigt. Bei Zentralstrahlmessung entfällt der letzte der drei Punkte. Inzwischen sind die zur Einschätzung dieser Parameter notwendigen Definitionen und auch zahlenmäßige Werte vorgestellt worden; der Formfaktor (Φ) und der Kapillarfaktor (K) werden in die nach V aufgelöste Gl. 2 eingesetzt; daraus ergibt sich

$$V = \frac{\Delta R \cdot F^2}{e_0} \cdot \frac{K}{\Phi}$$

Da am Gerät die Widerstandsänderungen als Spannungsimpulse abgelesen werden, wird ΔR durch $\frac{\Delta U}{D}$ ersetzt, wobei D als Impulshöhe in Volt definiert ist, die vom Impuls-generator bei einer Widerstandsänderung von 1Ω geliefert wird ($D = \frac{\Delta U}{\Delta R}$). Für F^2 kann man auch $\pi^2 \cdot R^4$ bzw. $10 \cdot R^4$ ($\pi^2 \approx 10$) schreiben, und die Gleichung nimmt folgende Form an (26):

$$V = 10 \frac{R^4 \cdot \Delta U \cdot K}{\rho_0 \cdot D \cdot \Phi} \quad (\text{Gl. 3})$$

V = Teilchenvolumen [μm^3]

R = Radius der Kapillaröffnung [μm]

ΔU = Impulshöhe [Volt]

D = Eichfaktor für die Beziehung zwischen ΔU und ΔR [$\frac{\text{Volt}}{\Omega}$]

K = Kapillarfaktor

Φ = Partikelformfaktor

5.2 Referenzeichung

Der Vorteil dieses Eichverfahrens ist, daß sämtliche mit der Messung zusammenhängenden Parameter und Fehler der Apparatur mit einbezogen sind. Bei einer bestimmten Geräteeinstellung können den Teilchen, die analysiert werden, Absolutwerte zugeordnet werden. Voraussetzung ist, daß Eichpartikel zur Verfügung stehen, die den zu untersuchenden Teilchen in Form und Größe ähnlich sind. Bei Partikelarten mit unterschiedlicher Form muß der Formfaktor berücksichtigt werden. Ein Nachteil zeigt sich darin, daß kaum Eichkörperchen mit genau definiertem und gering streuendem Volumen erhältlich sind. Bei der Erstellung von EEV-Verteilungskurven könnte man theoretisch zur Eichung die relativ wenig streuenden Latexpartikel verwenden, indem man auch den Formfaktor beachtet. Da aber der Größenbereich der Latexteilchen bei der für die Erythrozytenmessung optimalen Verstärkereinstellung am unteren Ende liegt, wo außerdem verhältnismäßig häufiger Störimpulse vorkommen, wird eine so vorgenommene Eichung recht ungenau. Deshalb wurde die Zuordnung der Volumina innerhalb des experimentellen Teiles dieser Arbeit mit Eichblut durchgeführt.

Das Prinzip der Referenzeichung besteht darin, daß den Größenklassen (= Kanäle, Fenster ...) des Channelyzers durch Vergleich mit Partikeln bekannten Volumens die entsprechenden Volumenwerte in μm^3 zugeordnet werden. Der zu ermittelnde konstante Vo-

lumenschritt eines jeden Kanales kann als Eichfaktor c bezeichnet werden.

Das Durchschnittsvolumen des 1. Kanales ($= \bar{V}_{C_1}$) liegt zwischen der oberen und unteren Grenze des Kanales:

$$\begin{aligned} \bar{V}_{C_1} &= \frac{0 + c}{2} = 0,5 c \mu\text{m}^3, \\ \text{entsprechend } \bar{V}_{C_2} &= \frac{c + 2c}{2} = 1,5 c \mu\text{m}^3 \text{ und} \\ \bar{V}_{C_3} &= \frac{2c + 3c}{2} = 2,5 c \mu\text{m}^3 \text{ usw.} \end{aligned}$$

Allgemein ausgedrückt kann man sagen, in einem beliebigen Kanal, der mit n nummeriert ist (n . Kanal oder Kanal n bzw. C_n), beträgt das Durchschnittsvolumen der Teilchen, die dort erfaßt werden $(n - 0,5) c \mu\text{m}^3 = \bar{V}_{C_n}$. Der Eichfaktor definiert sich somit als

$$c [\mu\text{m}^3] = \frac{\bar{V}_{C_n}}{(n - 0,5)}.$$

Die EEV-Verteilungskurven, die mit Normblut (Standardblut) erstellt werden, zeigen das Bild einer Normalverteilung. Die Basis der Kurven ist breiter als bei EEV-Verteilungskurven, die aus dem Blut gesunder Personen aufgezeichnet werden. Das mittlere Volumen (MCV) des Eichblutes muß mit dem Verteilungsgipfel (= am häufigsten vorkommende Population von Erythrozytenvolumina) zusammenfallen.

Der hier verwendete Coulter Channelyzer analysiert 100 Volumenklassen ($\hat{=}$ 100 Kanälen). Bezüglich der Feststellung des Kurvengipfels sind zwei Punkte zu beachten:

a) Auch bei der Registrierung von 4000 bzw. 10^4 Teilchen pro Spitzenkanal ist das empirisch resultierende Verteilungsmaximum ($= C_{n_{\text{max}}}$) noch nicht vollständig gesichert. Bei mehrmaliger Aufnahme einer EEV-V-Kurve derselben Probe können noch Schwankungen des Kurvengipfels (± 1 Kanäle) auftreten. Die Anzahl der Erythrozyten der beiden Volumenklassen, die zum Gipfelkanal benachbart liegen, ist im Verhältnis zur Anzahl des letzteren nur geringfügig weniger, so daß statistisch gesehen auch bei der Auszählung eines Kollektivs von über 10^5 Partikeln (wie das beim Channelyzer der Fall ist) der Zufall immer noch eine große Rolle spielt, welcher Kanal letztlich zum Verteilungsmaximum wird.

b) Die in der theoretischen Herleitung des Eichfaktors c benützte Annahme, daß die Mehrzahl oder der Durchschnitt der innerhalb eines Fensters registrierten Erythrozyten

in ihrem Volumen genau in der Mitte der unteren und oberen Grenze des Volumenbereiches liegen, wird häufig nicht erfüllt sein. Es ist durchaus verständlich, daß die tatsächliche Lage des Kurvenmaximums der wegen ihrer Endlichkeit willkürlichen Einteilung der Größenklassen nicht folgen muß. Dies ist in vielen Fällen durch eine leichte Asymmetrie des Verteilungsgipfels angedeutet. Je mehr Kanäle verwendet werden, desto geringer ist eine mögliche Verfälschung des reellen Verteilungsmaximums. Der Fehler wird niemals größer als c sein.

Es empfiehlt sich aus dem oben Geschilderten heraus, den jeweils erhaltenen $C_{n_{\max}}$ zu korrigieren. In vereinfachter Weise läßt sich das in Anlehnung an Kallee et al. (23) zeichnerisch vornehmen. Da nur relative EEV-Verteilungskurven aufgestellt werden, konstruiert man einfach die Mitte der Horizontalstrecke, die sich bei einer Höhe von $2/3$ im Verhältnis zum zufälligen Maximum ($\hat{=}$ Ordinatenwert von 66,6 %) als dortige Kurvenbreite ergibt. Der diesem Punkt zuzuordnende Kanalwert der Abszisse entspreche der Lage des reellen Gipfelmaximums. Oft wird auf diese Weise eine ungerade Kanalzahl auftauchen; dies verträgt sich durchaus mit den tatsächlichen Verhältnissen, wenn man sich noch einmal kurz an das erinnert, was oben im Punkt b erläutert wird.

Diese Art der Gipfelkorrektur könnte möglicherweise durch die artefizielle Rechtsschiefe der Coulter-Verteilungen beeinträchtigt werden. Beim Vergleich der Kurven a, b und c in Abb. 9 (S. 21) ist zu erkennen, daß die elektronische Korrektur des verwendeten Channelyzers für die obigen Belange ausreichend ist.

Als Eichblut wurde 4 C[®] Cell Control von Coulter Diagnostics verwandt. Das MCV ist mit einer Genauigkeit von $\pm 2 \mu\text{m}^3$ angegeben. Der Standard soll bei Zimmertemperatur für etwa fünf Tage und bei Aufbewahrung im Kühlschrank (nicht einfrieren!) für ca. 30 Tage stabil bleiben (8).

6. PROBENAUFBEREITUNG

Eine Blutprobe darf, um jegliche Hämolysen auszuschalten, nur aus ungestauter Vene entnommen werden; das Abziehen mit der Spritze ist zu vermeiden.

Das Antikoagulans soll die Resultate nicht beeinträchtigen. Als brauchbar erweist sich hierbei EDTA (Sequestren). Da zur Analyse nur geringe Blutmengen benötigt werden, verwendet man 2ml-EDTA-Röhrchen, welche 1 - 2 mg EDTA- Na_2 in fester Form enthal-

ten, und fängt damit das über die Kanüle austretende Venenblut auf.

Als Endverdünnung des Vollblutes empfiehlt sich ein Verhältnis von 1 : 50 000. Dies wird in zwei Stufen vorgenommen: Zuerst werden die Blutproben auf 1 : 500 (Verdünnung A) und anschließend nochmals um 1 : 100 ($\longrightarrow$ Verdünnung B $\cong$ 1 : 50 000) verdünnt.

Als Verdünnungslösung empfiehlt sich handelsüblich filtrierte Elektrolytlösung (z.B. Isoton von Coulter Electronics).

Zur Stabilität des entnommenen Blutes bzw. der Suspensionen läßt sich folgendes sagen: EDTA-antikoaguliertes Blut ist, sofern es in seinem Auffangröhrchen verschlossen aufbewahrt wird, bei Zimmertemperatur einen Tag lang, im Kühlschrank mindestens eine Woche (7) keinen Veränderungen unterworfen.

Im verdünnten Zustand sollten die Proben möglichst nicht mehr als eine Stunde und niemals länger als drei Stunden vor Aufnahme der Verteilungskurve stehen gelassen werden. An anderer Stelle (7) wird berichtet, daß beim Zwei-Stufen-Verdünnungsverfahren die Suspension A (1 : 500) stabiler sei als Lösung B (1 : 50 000 = Endverdünnung). Es sei deshalb ratsam, die Endverdünnung erst unmittelbar vor dem Meßvorgang herzustellen. Wenn routinemäßig immer mehrere Proben zunächst zubereitet werden, und daher zwangsläufig bis zur Verwendung noch einige Zeit vergeht, dann sei dies unbedenklicher bei den 1 : 500-Verdünnungen.

7. DIE VERWENDETEN GERÄTE UND IHRE EINSTELLUNGEN

7.1 Coulter Counter Modell F_N

Es handelt sich dabei um ein Einschwellenwertgerät. Zur Überwachung des Zählvorganges ist zusätzlich auch eine akustische Kontrolle in der Form eines kleinen Lautsprechers eingebaut, welcher bei jedem Tausender ein Signal abgibt, wobei der Rhythmus die regelmäßige Funktion anzeigt. Die Kapillaröffnung erscheint sichtbar projiziert; dadurch können Verstopfungen des Meßlochs rechtzeitig erkannt werden.

Meßkapillare: Durchmesser 100 μm , Länge ca. 70 μm

Verstärkungsschalter (Attenuation): 1

Stromschalter (Aperture): 8

Schwellenwertknopf (Threshold): 12

7.2 Coulter Channelyzer II

Das Gerät ist an den Counter angeschlossen, erhält über diesen die Impulse und ordnet sie in 100 Größenklassen ein. Der Meßvorgang dauert so lange an (Count Control: Stop at full scale), bis in irgendeinem der Kanäle die vorgewählte Anzahl von 4000 bzw. 10^4 Partikeln (Count range) ausgezählt ist. Die so entstandene relative Verteilungskurve kann anschließend über einen mit dem Channelyzer in Verbindung stehenden XY-Schreiber zu Papier gebracht werden.

Der Apparat besitzt eine elektronische Kurvenkorrektureinrichtung, um die artefizielle Rechtsschiefe der Coulter-Verteilungen zu vermindern. Es ist möglich, wahlweise Volumenverteilungskurven mit (Schalterstellung Edit: ON) oder ohne (Edit: OFF) Korrektur aufzunehmen. Auf diese Weise kann ein Eindruck über die Effektivität des Korrekturverfahrens, das dieser Channelyzer anwendet, gewonnen werden. Abb. 9 (S. 21) veranschaulicht das unterschiedliche Aussehen der Kurven, welches unter den jeweiligen Bedingungen entsteht. Mit Einschränkungen (s. Kap. 4.1, S. 22) darf der linke Schenkel des Verteilungsspektrums als reell angenommen werden. Durch Spiegelung um die Achse, die durch das korrigierte Kurvenmaximum von b (in Abb. 9) geht, erhält man die "tatsächliche" Lage des rechten Schenkels (a). Bei Verwendung einer Zentralstrahlkapillare entspricht die somit erlangte Verteilungskurve etwa der konstruierten Kurve a. Der Vergleich des Flächeninhaltes unter den Coulter-Kurven mit dem unter der "reellen" Verteilungskurve bietet die Möglichkeit einer quantitativen Aussage über die Unterschiede. Die folgenden Zahlenwerte sind gemittelt und beziehen sich auf an Hand von fünf verschiedenen Blutproben aufgenommene EEV-Verteilungskurven:

Das Verhältnis der Fläche unter der rechtsschiefen Verteilungskurve (unkorrigierte Verteilungskurve = Abb. 9 c, Edit: OFF) zur Fläche unter der "reellen" Verteilungskurve beträgt $\approx 1,48$. Kachel (22) findet einen Wert, der nur wenig hiervon abweicht; der entsprechende Quotient (der Nenner bezieht sich auf die Zentralstrahlkurve) beträgt bei ihm 1,45.

Wird die elektronische Kurvenkorrektur (Abb. 9 b) benutzt, ergibt sich ein Quotient $\left(\frac{\text{Fläche unter der korrigierten } V_t K}{\text{Fläche unter der reellen } V_t K} \right)$ von etwa 1,07. Daraus ersieht man, daß die apparative Diskriminierung der zur artefiziellen Kurvenschiefe führenden Impulse zwar nicht vollständig, jedoch zu einem großen Teil gewährleistet ist.

Edit: ON

Count Control: Stop at full scale

Count Range: $4000, 10^4$

Dauer eines Meßvorganges: ca. $3/4$ Min. bei Count Range = 4000

ca. $2 - 2\frac{1}{2}$ Min. bei Count Range = 10^4

7.3 Coulter Counter Modell 5

Dieses Gerät wurde zur Ermittlung der einzelnen hämatologischen Daten verwandt (Leuko, Ery, Hb, Hkt, MCV, Hb_E). Auf eine genauere Beschreibung soll in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden. Lediglich die prinzipiellen Grundlagen der Bestimmung des MCV sei an dieser Stelle kurz beleuchtet.

Die von jedem Einzelteilchen des Zellkollektivs der Analysensuspension stammenden Impulse werden ebenfalls in Volumenklassen eingeordnet und gespeichert. Nach Beendigung des Analysiervorganges wird der alle registrierte Zellen umfassende, aufsummierte Volumenausdruck durch die Anzahl dieser Einzelteilchen dividiert. Die Methode entspricht letzten Endes dem Prinzip der MCV-Bestimmungen aus Hämatokrit und Erythrozytenzahl.

8. BESTIMMUNG VON PARAMETERN, WELCHE DIE VERTEILUNGSKURVEN CHARAKTERISIEREN

8.1 Das MCV

Bekanntlich kommen bei normalen Blutproben ausschließlich symmetrische Gaußverteilungen vor (s. Kap. 5.2, S. 24). Die Tatsache, daß unter dieser Voraussetzung der Verteilungsgipfel dem MCV entspricht, ermöglicht die Bestimmung von letzterem auf Grund des korrigierten Gipfelkanalwertes ($= n_{\text{cor-max}}$):

$$\text{MCV } [\mu\text{m}^3] = (n_{\text{cor-max}} - 0,5) \cdot c$$

Der korrigierte Gipfelkanal ergibt sich nach der folgenden Formel als

$$n_{\text{cor-max}} = \frac{n_1_{66,6\%} + n_2_{66,6\%}}{2},$$

wobei n_1 immer die Kanalnummer des linken und n_2 die des rechten Kurvenschenkels be-

deutet, und der in Prozent ausgedrückte Index angibt, auf welchen Ordinatenwert sich die Angaben beziehen. Es wurde auf einen halben Kanal genau abgelesen. Die in den Tabellen des Normwertkollektivs aufgeführten Mittelwerte basieren auf nach dieser Methode erhaltenen Einzelwerten und weichen von den Angaben des Multi-Auto-analyzers (Coulter "S") meist etwas ab. Man darf sich innerhalb der Auswertung aber durchaus auf die ersteren beschränken, da die Differenzen von unterschiedlichem Vorzeichen und durchschnittlich $< \pm 1 \mu\text{m}^3$ sind; außerdem erfolgen die jahrgangsmäßigen Änderungen gleichsinnig.

8.2 Die Anisozytose

Anisozytose bedeutet ungleiche Größe von Zellen und soll quantitativ erfaßt werden. Bei den Erythrozyten ist dies mit Hilfe der Volumenverteilungskurven möglich. Dabei ist die Anisozytose der Streuung des Kurvenspektrums proportional. Die Breite der Verteilung in Höhe der Standardabweichung s spiegelt jedoch das Ausmaß der Anisozytose nur z.T. wider. Schließlich werden dabei auch nur 68,27 % aller Erys berücksichtigt. Wollte man tatsächlich die letzte kleinste und größte Zelle mit einbeziehen, so müßte man die Kurvenbreite an der Basis oder, was dem nahe kommt, in Höhe von $3s$ als Maßstab wählen. Das ist in praxi aber mit Schwierigkeiten verbunden, da die Verteilungskurven in diesem Bereich in ihrem Verlauf sehr oft gestört sind (artefizielle Fehler). Deshalb wurde die Stelle der Kurve aufgesucht, die $2s$ entspricht, wo die Breite also $4s$ beträgt. Immerhin werden auf diese Weise schon 95,45 % aller Erythrozyten erfaßt. Diesen Punkt findet man bei Gauß-Verteilungen in der Höhe von $1/8$ im Verhältnis zum Maximum, bei unseren Kurven bei einem Ordinatenwert von 12,5 %.

Es empfiehlt sich, zwischen einer absoluten und relativen Anisozytose zu unterscheiden, da einem Kurvengipfel, der in einem höheren Volumenbereich liegt, auch unter physiologischen Bedingungen eine größere Streuung zukommt, während der Variationskoeffizient konstant bleiben kann.

Die Anisozytose_{abs} ist die Differenz in μm^3 aus den beiden Abszissenwerten, die sich bei 12,5 % Kurvenhöhe finden, die A_{rel} der Quotient aus dem größeren und dem kleineren dieser zwei Werte.

Bei den EEV-Verteilungskurven, die der Channelyzer anbietet, ist die Lage des rechten Schenkels (s. Abb. 9, S. 21) noch nicht ganz korrekt. Deshalb muß der entsprechende Kanalwert ($n_{2,12,5\%}$) verbessert werden ($\rightarrow n_{\text{cor}-12,5\%}$).

Aus früheren Überlegungen heraus darf er auf folgende Weise (nur bei Normalblut !) berechnet werden:

$$n_{\text{cor-12,5 \%}}^2 = n_{\text{cor-max}} + (n_{\text{cor-max}} - n_{12,5 \%}^1)$$

Für die Anisozytose ergibt sich

$$A_{\text{abs}} [\mu\text{m}^3] = (n_{\text{cor-12,5 \%}}^2 - n_{12,5 \%}^1) \cdot c$$

$$A_{\text{rel}} = \frac{n_{\text{cor-12,5 \%}}^2 - 0,5}{n_{12,5 \%}^1 - 0,5}$$

Auf Grund der eben geschilderten Definition könnte man annehmen, es sei unerheblich, wo man letztlich die Kurvenbreite abliest. Genauso gut wäre es möglich, die Standardabweichung s zu bestimmen und für A_{abs} einfach $4s$ anzunehmen. Bei Gauß-Verteilungen ist das zwar theoretisch zulässig, jedoch kommen bei pathologischen Blutproben (insbesondere bei hämatolog. Erkrankungen) häufig unsymmetrische (d.h. nicht gaußverteilte) EEV-Verteilungskurven vor. Dort bereitet es größere Schwierigkeiten, die Stelle der Kurve, welche $2s$ oder auch s entspricht, zu finden. Zur Vereinfachung wendet man einfach die Definition, bei $1/8$ bzw. $12,5\%$ Ordinatenhöhe die Verteilungsbreite zu bestimmen, auch auf solche Kurven an und vergleicht die gefundenen Werte mit den Normbereichen. Infolgedessen ist es weiterhin notwendig, die Anisozytose formelmäßig allgemeingültiger auszudrücken, da man ja auch bei den unsymmetrischen Kurven den rechten Kanalwert ($n_{12,5 \%}^2$) korrigieren muß, und die obige Methode, die nur für Normalblut gilt, auf pathologische EEV-Verteilungskurven nicht in jedem Falle übertragen werden kann.

Der rechte Kanalwert muß um einen konstanten Faktor ($\text{cor } n_{12,5 \%}^2$) reduziert werden, der sich aus der unvollständigen elektronischen Kurvenkorrektur des Gerätes ergibt:

$$n_{\text{cor-12,5 \%}}^2 = n_{12,5 \%}^2 \cdot \text{cor } n_{12,5 \%}^2$$

Man kann den Faktor statistisch als Mittelwert berechnen, der sich nach folgender Formel bei Berücksichtigung der Verteilungskurven aller ausgewerteten (N = Anzahl) norma-

Ien Blutproben ableiten läßt:

$$\text{cor}_{n_{2,12,5\%}} = \frac{\sum \frac{n_{\text{cor-max}} + (n_{\text{cor-max}} - n_{1,12,5\%})}{n_{2,12,5\%}}}{N}$$



$$\begin{aligned} \text{An.}_{\text{abs}} [\mu\text{m}^3] &= (n_{2, \text{cor-12,5\%}} - n_{1,12,5\%}) \cdot c = \\ &= [(n_{2,12,5\%} : \text{cor}_{n_{2,12,5\%}}) - n_{1,12,5\%}] \cdot c \\ \text{An.}_{\text{rel}} &= \frac{n_{2, \text{cor-12,5\%}} - 0,5}{n_{1,12,5\%} - 0,5} = \frac{(n_{2,12,5\%} \cdot \text{cor}_{n_{2,12,5\%}}) - 0,5}{n_{1,12,5\%} - 0,5} \end{aligned}$$

Für $\text{cor}_{n_{2,12,5\%}}$ ergab sich der Wert 0,96.

Die Bestimmung des Eichfaktors c wurde entsprechend den in Abschn. II, Kap. 5.2 (S. 24) aufgestellten Vorschriften vorgenommen.

Bei Verwendung des Standardblutes (4 C[®]) gilt

$$c [\mu\text{m}^3] = \frac{\text{MCV}}{n_{\text{cor-max}} - 0,5}$$

28 nacheinander aufgenommene Verteilungskurven, wobei auf maximal 4000 Teilchen pro Kanal ausgezählt wurde, und 18 Kurven mit 10^4 registrierten Partikeln pro Spitzenkanal dienten zur Berechnung des Eichfaktors. Als Mittelwert wurde für c der Betrag von $2,42 \mu\text{m}^3$ gefunden. Er erwies sich an Hand der während der Untersuchungszeit durchgeführten Kontrollen bei Verwendung von Eichblut mit unterschiedlichem MCV als korrekt.

9. KOLLEKTIV

Zur Ermittlung von Normwerten dienten Probanden, die auf Grund klinischer, physikalischer und klinisch chemischer Untersuchungen als gesund galten. Die Alters- und Geschlechtsverteilung des Probandenkollektivs setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Alter</u> (Jahre)	<u>Anzahl</u>	
	♂	♀
20 - 29	10	11
30 - 39	10	11
40 - 49	12	11
50 - 59	11	11
60 - 69	11	11
> 70	7	6
Summe	61	61

Die Zusammensetzung der Patientenkollektive ergab sich wie folgt:

10	Patienten mit	M. Hodgkin
8	"	" chronisch myeloischer Leukämie
59	"	" Hepatitis
33	"	" Lebercirrhose

Die Diagnosen waren mittels klinischer, biptischer, klinisch-chemischer und röntgenologischer Untersuchungsmethoden gesichert.

10. STATISTISCHE BERECHNUNG

Die wichtigsten auftauchenden statistischen Begriffe sollen hier kurz erläutert werden:

a) das arithmetische Mittel $\bar{x}$:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{\text{Summe aller Beobachtungen}}{\text{Anzahl der Beobachtungen}} \\ &= \frac{1}{N} \cdot (x_1 + x_2 + \dots + x_N) \\ &= \frac{\sum x}{N}\end{aligned}$$

b) die Gaußsche Normalverteilung:

Die Normalverteilung hat die Form einer symmetrischen Glockenkurve. Bei Stichproben errechnet sie sich aus

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \bar{x}}{s}\right)^2}$$

Die Verteilung ist somit durch zwei Parameter vollständig charakterisiert. Es sind dies der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s . Für letztere Größe gilt

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Die Standardabweichung ist ein Maßstab für die "Breite" der Glocke; $+s$ und $-s$ berührt die beiden Wendepunkte der Verteilungskurve. Innerhalb des Intervalles von $\pm 1s$ um den Mittelwert $\bar{x}$ liegen 68,27 % aller Werte. Für $\pm 2s$ gilt entsprechend 95,45 % und für $\pm 3s$ 99,73 %. Bei Verwendung dieser Punkte als Abszissenwerte läßt sich eine Aussage über die jeweils vorliegende Ordinatenstrecke machen. Ist $y_{\max}$ die höchste Stelle der Verteilung, so finden wir y_{1s} relativ dazu in $\frac{5}{8}$ Höhe = $\frac{5}{8} y_{\max} \triangleq 62,5 \% y_{\max}$. In diesem Zusammenhang gilt:

$$y_{1s} = \frac{5}{8} y_{\max} \triangleq 62,5 \% y_{\max}$$

$$y_{2s} = \frac{1}{8} y_{\max} \triangleq 12,5 \% y_{\max}$$

$$y_{3s} = \frac{1}{80} y_{\max} \triangleq 1,25 \% y_{\max}$$

In den Formeln wird zur Kennzeichnung der Standardabweichung häufig auch der Buchstabe σ und für den Mittelwert ein μ verwandt. Bei korrekter Betrachtungsweise besteht der Unterschied darin, daß σ und μ die tatsächliche Standardabweichung bzw. den reellen Mittelwert symbolisieren, während s und $\bar{x}$ für eigentlich nur geschätzte Werte dieser Parameter stehen, die man auf Grund von Stichproben erhält. Dies sei kurz am Beispiel der EEV-Verteilungskurven veranschaulicht. Wollte man das wirkliche MCV ($\hat{=} \mu$) und σ berechnen, so müßte man nicht nur eine Blut-"Probe", sondern sämtliche Erythrozyten der betreffenden Person analysieren, was natürlich unmöglich ist. Man beschränkt sich deshalb auf eine Stichprobe ($10^5 - 1,5 \cdot 10^5$ Erys), wobei weiter vorausgesetzt wird, daß diese Probe ein einigermaßen repräsentatives Abbild der Volumenverteilung aller im Körper des Individuums vorhandenen roten Blutkörperchen bietet.

Will man eine eventuelle Korrelation zwischen Streuung und Mittelwert einer Meßgröße erfassen, so benützt man den Variationskoeffizienten VK. Er ist definiert als das Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}}$$

Meist wird er in Prozent angegeben

$$\implies [VK] \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

c) der Konfidenzbereich:

Der Konfidenzbereich, der von zweien aus der Stichprobe (in den Ergebnistabellen $\hat{=}$ Kollektiv) zu errechnenden Werten x_1 (x_1) und x_r (x_2) - Vertrauensgrenzen genannt - begrenzt wird, sagt aus, daß innerhalb dieser Grenzen ein geschätzter bzw. als Mittelwert berechneter Parameter mit großer Wahrscheinlichkeit liegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird in diesem Zusammenhang mit 2α symbolisiert. Die Vertrauenswahrscheinlichkeit in % definiert sich folglich mit $100 \cdot (1 - 2\alpha)$.

Die beiden Vertrauensgrenzen lassen sich nach der folgenden Gleichung berechnen:

$$x_{1,2} = \bar{x} \pm t_{2\alpha, N-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{N}}$$

t ist die dem Umfang der Stichprobe und der geforderten Irrtumswahrscheinlichkeit entsprechende Signifikanzschranke der t-Verteilung (Student-Verteilung)

Signifikanz bedeutet Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$, d.h., die Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses darf nicht mehr als 5% auf Zufall beruhen. Ein Unterschied zwischen zwei Maßzahlen wird dann statistisch als gesichert bzw. signifikant bezeichnet, wenn er so groß ist, daß die Wahrscheinlichkeit seines Nichtbestehens geringer als 5% ($2\alpha = P \leq 0,05$) ist.

III. ERGEBNISSE

1. NORMWERTE

Tabelle 1 enthält Mittelwerte, Standardabweichungen und Konfidenzbereiche aller hämatologischen Parameter für das Gesamtkollektiv der zur Normwertermittlung herangezogenen Personen. Die Tabellen 2 - 5 zeigen die entsprechenden Ergebnisse für die nach Alter und Geschlecht getrennten Untergruppen (Tab. 2 u. 3 männl., 4 u. 5 weibl.).

Angegeben werden:	Dimension
Ery = Erythrozytenzahl	$10^6/\mu\text{l}$
Hkt = Hämatokrit	Vol %
Hb = Hämoglobinkonzentration	g/100 ml
Hb _E = durchschnittl. Hb.-Gehalt des Einzelerthrozyten	pg
Leuko = Leukozytenzahl	$10^3/\mu\text{l}$
MCV = mittleres korpuskuläres Volumen	μm^3
An _{abs} = absolute Anisozytose	μm^3
An _{rel} = relative Anisozytose	-

Die Ergebnisse für Ery ... Leuko wurden mit dem Coulter S ermittelt.

Die Angaben für MCV und Anisozytose wurden aus den mit dem Channelyzer gefundenen Kurven abgelesen.

Für das Gesamtkollektiv aller 122 männlichen und weiblichen Probanden beträgt der MCV-Mittelwert $90,0 \mu\text{m}^3$ bei einer Standardabweichung s von $5,7 \mu\text{m}^3$. Bezüglich der absoluten Anisozytose ergeben sich $61,9 \mu\text{m}^3$ ($s = 5,5 \mu\text{m}^3$), der Relativwert (An_{rel}) liegt bei 2,05 ($s = 0,12$).

Die entsprechend der Aufteilung in Altersgruppen gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß sich die aus den jüngeren Jahrgängen erhaltenen MCV-Mittelwerte häufig unter dem Schnitt des Gesamtkollektives bewegen und umgekehrt. Auch bei der absoluten Anisozytose ist eine solche Tendenz zu erkennen.

Tabelle 1: Normwertbereiche: männliche und weibliche Probanden insgesamt,
Aufteilung nach Geschlecht
N = Größe des Kollektivs

Gesamt- kollektiv		Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
♂ + ♀ N = 122	Ery	4,80	0,34	4,74	4,86
	Hkt	43,3	2,7	42,8	43,8
	Hb	14,7	1,0	14,5	14,9
	Hb _E	30,6	1,4	30,3	30,9
	Leuko	6,82	1,96	6,46	7,18
	MCV	90,0	5,7	89,0	91,0
	Anisocyt.				
	abs	61,9	5,5	60,9	62,9
	rel	2,05	0,12	2,03	2,07
♂ N = 61	Ery	5,06	0,34	4,97	5,15
	Hkt	46,0	2,5	45,3	46,6
	Hb	15,6	0,9	15,4	15,8
	Hb _E	30,8	1,4	30,4	31,2
	Leuko	7,05	1,95	6,55	7,55
	MCV	90,3	6,3	88,7	91,9
	Anisocyt.				
	abs	62,8	6,0	61,2	64,3
	rel	2,07	0,13	2,04	2,10
♀ N = 61	Ery	4,54	0,34	4,44	4,63
	Hkt	40,7	2,9	39,9	41,4
	Hb	13,8	1,0	13,5	14,0
	Hb _E	30,3	1,4	30,0	30,7
	Leuko	6,59	1,97	6,08	7,09
	MCV	89,7	5,0	88,4	91,0
	Anisocyt.				
	abs	61,1	4,8	59,9	62,3
	rel	2,03	0,11	2,01	2,06

Tabelle 2: Normwertbereiche: männliche Probanden nach Alter

Altersgruppe (Jahre)		Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
♂ 20 - 29 N = 10	Ery	5,24	0,22	5,08	5,40
	Hkt	45,8	2,7	43,9	47,7
	Hb	15,9	0,9	15,2	16,6
	Hb _E	30,3	1,1	29,5	31,1
	Leuko	6,75	1,37	5,77	7,73
	MCV	87,1	6,4	82,6	91,7
	Anisocyt.				
	abs	57,1	3,2	54,8	59,4
	rel	1,98	0,08	1,92	2,04
♂ 30 - 39 N = 10	Ery	4,95	0,31	4,73	5,17
	Hkt	44,5	2,1	43,0	46,0
	Hb	15,1	0,7	14,6	15,7
	Hb _E	30,6	1,8	29,4	31,9
	Leuko	5,70	1,16	4,87	6,53
	MCV	88,7	6,8	83,9	93,5
	Anisocyt.				
	abs	62,2	5,1	58,5	65,9
	rel	2,08	0,10	2,01	2,16
♂ 40 - 49 N = 12	Ery	4,98	0,30	4,79	5,18
	Hkt	46,1	2,7	44,4	47,8
	Hb	15,5	1,1	14,8	16,1
	Hb _E	31,0	1,4	30,2	31,9
	Leuko	6,93	2,49	5,35	8,52
	MCV	91,4	4,2	88,7	94,0
	Anisocyt.				
	abs	63,5	4,6	60,6	66,5
	rel	2,07	0,08	2,02	2,12

Tabelle 3: Normwertbereiche: männliche Probanden nach Alter

Altersgruppe (Alter)		Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
♂ 50 - 59 N = 11	Ery	5,07	0,40	4,80	5,34
	Hkt	46,9	2,5	45,2	48,6
	Hb	15,9	0,9	15,3	16,5
	Hb _E	31,4	1,4	30,5	32,3
	Leuko	7,28	1,78	6,08	8,48
	MCV	93,0	5,2	89,5	96,4
	Anisocyt.				
	abs	65,3	7,8	60,1	70,6
	rel	2,09	0,16	1,98	2,20
♂ 60 - 69 N = 11	Ery	5,06	0,46	4,76	5,37
	Hkt	46,2	2,6	44,5	47,9
	Hb	15,7	0,8	15,1	16,2
	Hb _E	31,0	1,7	29,8	32,2
	Leuko	7,77	1,76	6,59	8,95
	MCV	90,9	8,5	85,2	96,6
	Anisocyt.				
	abs	64,1	5,3	60,6	67,7
	rel	2,11	0,17	1,99	2,22
♂ > 70 N = 7	Ery	5,07	0,30	4,79	5,35
	Hkt	46,1	2,6	43,7	48,6
	Hb	15,3	0,9	14,5	16,1
	Hb _E	30,2	0,7	29,5	30,9
	Leuko	8,13	2,42	5,89	10,36
	MCV	90,5	5,6	85,3	95,7
	Anisocyt.				
	abs	64,1	6,7	57,9	70,3
	rel	2,10	0,13	1,98	2,22

Tabelle 4: Normwertbereiche: weibliche Probanden nach Alter

Altersgruppe (Alter)		Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
♀ 20 - 29 N = 11	Ery	4,53	0,28	4,34	4,72
	Hkt	39,9	2,1	38,5	41,3
	Hb	13,7	1,0	13,1	14,4
	Hb _E	30,3	1,2	29,5	31,1
	Leuko	6,70	1,57	5,64	7,76
	MCV	89,2	4,1	86,4	91,9
	Anisocyt.				
	abs	60,4	2,9	58,3	62,5
	rel	2,01	0,07	1,96	2,07
♀ 30 - 39 N = 11	Ery	4,45	0,39	4,19	4,70
	Hkt	40,5	3,0	38,5	42,6
	Hb	13,8	1,0	13,1	14,5
	Hb _E	31,0	1,1	30,3	31,8
	Leuko	6,38	1,76	5,20	7,57
	MCV	90,9	4,6	87,8	94,0
	Anisocyt.				
	abs	60,1	4,3	57,2	62,9
	rel	1,99	0,08	1,93	2,05
♀ 40 - 49 N = 11	Ery	4,58	0,26	4,40	4,76
	Hkt	40,5	2,1	39,2	41,9
	Hb	13,7	0,8	13,2	14,3
	Hb _E	29,9	1,0	29,2	30,6
	Leuko	6,43	2,01	5,07	7,78
	MCV	87,5	3,8	84,9	90,0
	Anisocyt.				
	abs	59,9	4,7	56,7	63,0
	rel	2,05	0,13	1,96	2,13

Tabelle 5: Normwertbereiche: weibliche Probanden nach Alter

Altersgruppe (Jahre)		Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
♀ 50 - 59 N = 11	Ery	4,51	0,38	4,26	4,76
	Hkt	40,5	3,3	38,4	42,7
	Hb	13,8	1,3	12,9	14,7
	Hb _E	30,5	1,4	29,6	31,5
	Leuko	6,10	1,90	4,83	7,37
	MCV	89,0	6,1	84,9	93,2
	Anisocyt.				
	abs	61,1	5,2	57,6	64,5
	rel	2,05	0,09	1,99	2,11
♀ 60 - 69 N = 11	Ery	4,60	0,42	4,32	4,88
	Hkt	40,9	3,2	38,7	43,1
	Hb	13,8	1,1	13,0	14,5
	Hb _E	29,9	1,6	28,9	31,0
	Leuko	6,99	2,79	5,12	8,86
	MCV	90,3	6,4	86,0	94,6
	Anisocyt.				
	abs	63,1	5,8	59,2	67,0
	rel	2,08	0,12	2,00	2,16
♀ > 70 N = 6	Ery	4,57	0,57	3,97	5,16
	Hkt	42,2	4,5	37,5	46,9
	Hb	13,7	1,2	12,4	14,9
	Hb _E	30,1	2,0	27,9	32,3
	Leuko	7,20	1,81	5,30	9,10
	MCV	92,9	3,7	89,0	96,7
	Anisocyt.				
	abs	62,7	5,9	56,6	68,9
	rel	2,03	0,15	1,87	2,18

2. HÄMATOLOGISCHE ERKRANKUNGEN

2.1 M. Hodgkin

10 Patienten mit Lymphogranulomatose wurden untersucht. Es wurden Verlaufsbeobachtungen durchgeführt. Die Wiederholungsuntersuchungen zeigten keine statistisch gesicherten Abweichungen. In der Tabelle 6 sind die jeweiligen Mittelwerte angegeben.

Der mittlere MCV-Wert der Hodgkin-Gruppe beträgt $95,0 \mu\text{m}^3$, bei der absoluten und relativen Anisozytose erhält man $75,4 \mu\text{m}^3$ bzw. 2,41. Im Vergleich zum Normkollektiv erscheinen das MCV leicht, beide Anisozytosewerte stärker erhöht.

2.2 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte der untersuchten hämatologischen Parameter. Ähnlich wie beim Hodgkin wurden auch bei den acht Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie über einen Zeitraum von 1 - 2 Monaten Verlaufsbeobachtungen durchgeführt.

Bei allen Erkrankten fand sich eine ausgeprägte Anämie und eine erheblich vergrößerte Leukozytenzahl. Das mittlere MCV dieser Gruppe liegt bei $90,0 \mu\text{m}^3$, also genau im Bereich der Norm; die entsprechenden Werte für die An_{abs} und An_{rel} zeigen sich mit $86,7 \mu\text{m}^3$ und 3,38 weit über der Norm.

Tabelle 6: Hämatologische Befunde bei Patienten mit M. Hodgkin

M = visuell erkennbare Mischverteilung
M(?) = visuell nicht eindeutig erkennbare Mischverteilung
EK = Patient erhielt Erythrozytenkonzentrate

Patient	Alter	Geschl.	Ery	Hkt	Hb	Hb _E	Leuko	MCV	An _{abs}	An _{rel}	Bemerk.
1	51	♂	5,1	48	15,4	30,3	5,7	94	77	2,38	M(?)
2	34	♂	3,1	30	9,8	31,9	7,3	97	92	2,61	M
3	59	♂	4,5	41	13,8	30,4	3,5	91	71	2,47	M, EK
4	44	♀	4,0	38	11,4	28,1	6,5	95	82	2,69	M(?)
5	24	♂	3,2	32	10,3	32,5	5,0	100	94	2,90	M(?), EK
6	63	♂	3,2	30	10,0	32,0	6,9	94	72	2,24	EK
7	39	♀	4,3	40	13,1	30,5	5,2	93	63	2,08	
8	21	♀	3,0	27	9,5	31,7	2,0	90	68	2,27	
9	23	♀	3,4	37	11,8	34,4	6,0	109	73	2,16	
10	69	♀	4,7	41	12,7	26,8	20,5	87	63	2,30	
Ø			3,85	36,4	11,8	30,9	6,4	95,0	75,4	2,41	

Tabelle 7: Hämatologische Befunde bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie

Patient	Alter	Geschl.	Ery	Hkt	Hb	Hb _E	Leuko	MCV	An _{abs}	An _{rel}	Bemerk.
1	69	♀	3,1	26	10,1	32,7	20,2	84	84	3,15	M
2	66	♀	3,2	34	10,6	33,6	120,0	106	94	2,44	M
3	63	♀	3,4	35	9,8	28,8	76,8	103	128	7,23	M
4	30	♀	2,7	24	8,3	30,8	14,5	89	65	2,12	
5	68	♂	2,5	22	7,7	30,0	31,2	88	70	2,31	M
6	69	♂	4,0	36	10,9	27,7	66,0	90	118	5,26	M, EK
7	74	♂	3,1	25	9,8	31,3	1,4	81	64	2,26	EK
8	72	♂	3,0	24	9,7	32,9	7,1	80	71	2,27	
Ø			3,13	28,3	9,6	31,0	42,2	90,0	86,7	3,38	

3. LEBERERKRANKUNGEN

3.1 Hepatitis

In Tabelle 8 sind die Mittelwerte der hämatologischen sowie einiger klinisch chemischer Parameter angegeben. Es wurde das Blut von insgesamt 59 Hepatitis-Patienten untersucht, von denen eine große Zahl monatlich die Lebersprechstunde aufsuchen, um dort ambulant kontrolliert zu werden.

Neben den Veränderungen der krankheitsspezifischen Parameter erkennt man ein normales Blutbild.

Das mittlere MCV weicht mit $91,6 \mu\text{m}^3$ ($s = 8,1 \mu\text{m}^3$) nicht von der Norm ab, ebenso die relative Anisozytose mit dem Wert von 2,17 ($s = 0,32$). Dagegen ist die An_{abs} mit $67,3 \mu\text{m}^3$ ($s = 9,6 \mu\text{m}^3$) etwas erhöht.

3.2 Lebercirrhose

Tabelle 9 enthält die Mittelwerte der untersuchten Parameter. Die Verhältnisse bei Lebercirrhose wurden anhand von 33 Patienten beleuchtet, von denen die meisten wiederum ambulant in die Poliklinik einbestellt waren.

Das MCV findet sich mit $92,7 \mu\text{m}^3$ ($s = 9,9 \mu\text{m}^3$) nicht wesentlich erhöht. Dagegen weichen die Anisozytosewerte etwas von der Norm ab. Die mittlere An_{abs} dieser Krankheitsgruppe beträgt $72,1 \mu\text{m}^3$ ($s = 13,4 \mu\text{m}^3$), der entsprechende Betrag der An_{rel} liegt bei 2,30 ($s = 0,42$). Die meisten anderen hämatologischen Werte erscheinen leicht erniedrigt.

Tabelle 8: Hämatolog. und klin. chem. Befunde bei Patienten mit Hepatitis

N = Größe des Kollektivs

Dimensionen: Blutbild: wie bei den Normwerttabellen

Transaminasen in U/l

Quick in %

Serum-Fe in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$

Elektrophorese in rel %

N = 59

.	Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
Ery	4,62	0,58	4,46	4,77
Hkt	42,0	4,1	40,9	43,1
Hb	14,2	1,4	13,8	14,5
Hb _E	30,8	2,8	30,1	31,6
Leuko	6,1	2,4	5,5	6,8
MCV	91,6	8,1	89,5	93,7
An _{abs}	67,3	9,6	64,7	69,8
An _{rel}	2,17	0,32	2,09	2,26
SGOT	27,1	28,5	19,5	34,6
SGPT	42,6	58,1	27,1	58,0
Quick	91,8	13,9	88,1	95,5
Serum-Fe	137,9	55,0	123,5	152,4
Alb	57,0	5,2	55,6	58,4
α_1	3,3	1,0	3,1	3,6
α_2	7,3	1,6	6,8	7,7
β	10,5	1,9	10,0	11,1
γ	21,5	6,3	19,9	23,2

Tabelle 9: Hämatolog. und klin. chem. Befunde bei Patienten mit Lebercirrhose

N = 33

	Mittelwert	Standard- abweichung	Konfidenzbereich für P = 0,05	
Ery	4,46	0,61	4,25	4,68
Hkt	41,3	5,0	39,5	43,1
Hb	13,7	1,8	13,1	14,4
Hb _E	30,8	3,5	29,6	32,1
Leuko	5,9	2,7	5,0	6,9
MCV	92,7	9,9	89,2	96,2
An _{abs}	72,1	13,4	67,3	76,8
An _{rel}	2,30	0,42	2,15	2,45
SGOT	34,1	24,5	25,4	42,8
SGPT	43,8	45,8	27,6	60,1
Quick	85,2	17,1	79,1	91,3
Serum-Fe	122,5	59,0	101,6	143,4
Alb	53,8	7,4	51,2	56,5
α_1	3,4	1,0	3,1	3,8
α_2	7,6	1,5	7,1	8,1
β	10,6	2,3	9,8	11,5
γ	24,4	8,6	21,4	27,5

IV. DISKUSSION

1. NORMWERTE UND ERFASSUNG VON NORMWERTBEREICHEN

1.1 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren

1.1.1 MCV

Im Blut von 122 Kontrollpersonen (61 männliche, 61 weibliche) fand sich ein mittleres Erythrozytenvolumen von $90,0 \mu\text{m}^3$ ($s = 5,7 \mu\text{m}^3$). Die Ermittlung dieser Werte erfolgte aus den Verteilungskurven, die mit dem Coulter Counter F_N und Channelyzer mit angeschlossenem XY-Schreiber aufgezeichnet wurden.

Okuno (28, 29) untersuchte mit dem Coulter-Modell S 500 gesunde Testproben, indem er bei ca. 2/5 des Materials Blutbankblut und bei dem Rest Klinikangestellte hinzuzog. Er fand dabei als Mittelwert rund $91,3 - 91,4 \mu\text{m}^3$. Die Streuung dieser Einzelwerte ist, wenn man 1 s als Maßstab heranzieht, mit $4,7 \mu\text{m}^3$ etwas geringer als bei den obigen selbst durchgeführten Untersuchungen.

Becker und Hollender (1) arbeiteten mit dem älteren Coulter Counter B, einem Gerät, das artefizielle rechtsschiefe Verteilungen lieferte. An Hand von 40 gesunden Versuchspersonen wurde ein mittleres Ery-Volumen von $89 \mu\text{m}^3$ ermittelt.

England und Mitarb. (13) kamen auf ähnliche Weise zu einem MCV von $87,6 \mu\text{m}^3$ ($s = 3,6 \mu\text{m}^3$) mit Blut von 75 Klinikangestellten. Auffällig ist bei diesen Untersuchungen die geringe Streuung der einzelnen MCV-Werte ($1 s = 3,6 \mu\text{m}^3$). Erwähnenswert ist weiterhin, daß dabei ein "Coulter Channelyzer" zur Anwendung kam; trotzdem wird noch die rechtsschiefe EEV-Verteilungskurve als reell angenommen, möglicherweise wegen der unvollständigen Korrektur durch das elektronische Diskriminierungsverfahren.

Diese Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Frühere MCV-Bestimmungen, die mit manuellen Methoden durchgeführt wurden, ergaben meist Werte, die um rund $5 \mu\text{m}^3$ niedriger lagen als die heute mit den elektronischen Verfahren gewonnenen Ergebnisse. Okuno (29) vermutet, daß dafür zu wenig genaue Erythrozytenzählungen bei den alten Methoden verantwortlich sein könnten. Jedenfalls erhielten auch Silver und Frankel (34) ähnliche Werte (Normbereich = $83,6 - 99,2 \mu\text{m}^3$) wie

diejenigen, welche in Tabelle 10 angeführt werden, als sie den "Coulter S" verwendeten, jedoch ist ihr Testkollektiv - die Studie basiert auf den Blutproben von 100 Blutspendern und 100 Studentinnen - altersmäßig stark eingeschränkt.

Die Erythrozytenvolumen-Durchschnittswerte der einzelnen Stichprobengruppen (Tab. 10) stimmen gut überein; das niedrigere Ergebnis von England (13) erklärt sich aus dem Testkollektiv, das hauptsächlich aus jüngeren Probanden besteht, denn bei jüngeren Personen kommen häufiger kleinere MCV-Werte vor.

Die Streubreiten der Einzelwerte der untersuchten Gruppen sind wahrscheinlich von der Art der Selektion des in die Auswertung eingehenden Materials beeinflusst. So stellt der Gesichtspunkt "physiologisch gesund" ebenso wie die Festlegung auf bestimmte Personengruppen (Pflegepersonal, Studenten usw.) eine engere Einschränkung des Testkollektivs dar als die Auswahl nach hämatologisch normalen Blutwerten, die einen weiter gestreuten Personenkreis zuläßt. Dem entsprechend wächst auch die Wahrscheinlichkeit, daß die Parameter in größerem Ausmaße variieren, was sich in der Streubreite niederschlägt.

Tabelle 10: Zusammenstellung von Normbereichen ($\bar{x} + 2s$):
Eigene Untersuchungen und Befunde der Literatur

	Anzahl	MCV [μm^3]	Hb _E [pg]
eigene Ergebnisse	61 ♂	90,3 $\pm$ 12,6	30,8 $\pm$ 2,8
	61 ♀	89,7 $\pm$ 10,0	30,3 $\pm$ 2,8
Okuno, T. (28, 29)	500 ♂	91,4 $\pm$ 9,2	30,7 $\pm$ 3,3
	♀	91,3 $\pm$ 9,4	30,5 $\pm$ 3,3
Becker, H.J., u. Hollender, J. (1)	40 ♂ ♀	89 $\pm$ (keine Ang.)	keine Ang.
England, J.M. (13)	40 ♂	87,7 $\pm$ 7,0	keine Ang.
	35 ♀	87,6 $\pm$ 7,2	keine Ang.

1.1.2 Alters- und Geschlechtsbeziehungen

Die Korrelationsanalyse läßt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem MCV und dem Alter der Testpersonen erkennen. In Abb. 10 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt.

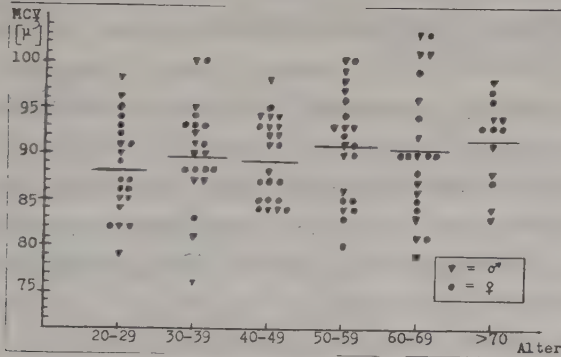


Abb. 10: MCV und Alter

Bei älteren Probanden findet man zwar häufiger höhere MCV-Werte (und umgekehrt), jedoch zeigt sich keine statistisch signifikante Beziehung zwischen den Durchschnittsvolumina der aufgegliederten Jahrgangsguppen und deren zugehörigen Alterbereichen.

Dem hingegen berichtet Okuno (28, 29) in seiner Studie, daß die älteren Altergruppen ein statistisch signifikantes, höheres MCV haben als die jüngeren. Bei Okuno steigen die durchschnittlichen Gruppen-MCV-Werte stetig von ca. 90 auf 93 μm^3 an.

In Übereinstimmung mit anderen lassen sich im Material der vorliegenden Untersuchung keine Geschlechtsunterschiede in bezug auf das mittlere Erythrozytenvolumen feststellen. Dies bestätigen auch Becker und Kaltwasser (2) bzw. England u. Mitarb. (13) mit ihren Studien.

In keiner der hier zitierten Arbeiten werden Angaben über die Verhältnisse bei Neugeborenen und Kleinkindern gemacht.

1.1.3 Anisozytose

Die Anisozytose ist – soweit in der Literatur ersichtlich – in ähnlicher Weise nur von England und Mitarb. (13) bestimmt worden. Die für die absolute und relative Anisozytose gefundenen Werte und Standardabweichungen sind in Tab. 11 den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von England gegenübergestellt.

Tabelle 11: Zusammenstellung von Normbereichen ($\bar{x} \pm 2s$):
Anisozytose im Normalkollektiv

	Anzahl	An _{abs}	An _{rel}
eigene Ergebnisse	61 ♂	62,8 $\pm$ 12,0	2,07 $\pm$ 0,26
	61 ♀	61,1 $\pm$ 9,6	2,03 $\pm$ 0,22
England, J.M. (13)	40 ♂	58,1 $\pm$ 7,0	1,94 $\pm$ 0,11
	35 ♀	58,3 $\pm$ 6,8	1,94 $\pm$ 0,13

Der direkte Vergleich ist nur mit diesen Ergebnissen möglich, da der gleiche apparative Aufbau verwandt wurde. Im theoretischen Ansatz unterscheiden sich die Resultate. In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, daß bei den Erythrozytenvolumen-Verteilungskurven eine Normalverteilung vorliegt. Im Gegensatz dazu nahmen England und Mitarb. eine logarithmische Verteilung an. Für die Definition ihrer Anisozytose legten sie den Variationsbereich von 95 % der Erythrozyten innerhalb einer Verteilung zugrunde.

In der Literatur finden sich Angaben über den Variationskoeffizienten (VK) der EEV-Verteilungskurven. Die absolute Anisozytose kann als 4 s-Wert (auf die Einzelverteilungskurven bezogen !) abgeleitet werden. Für den Variationskoeffizienten gilt folgende Gleichung:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Nach s aufgelöst wird der Ausdruck $VK \cdot \frac{\bar{x}}{100}$ erhalten

$$\Longrightarrow 4s = An_{abs} = 4VK \cdot \frac{\bar{x}}{100}$$

Ebenso ist es möglich, aus An_{abs} bei Normalkurven den Variationskoeffizienten zu berechnen:

$$VK = \frac{An_{abs}}{4 \cdot \bar{x}} \cdot 100$$

Es ergibt sich dann für das Gesamtkollektiv der 122 Männer und Frauen ($MCV = 90 \mu m^3$, $An_{abs} \approx 62 \mu m^3$) ein mittlerer VK von 17 %. Er liegt damit klar unter dem Wert von Gutmann (18), welcher 22,5 % angibt, wobei jedoch die artefizielle Rechtsschiefe seiner Verteilungen mit eingeht. Andererseits aber hat Kachel (21) bei der Aufstellung von EEV-Verteilungskurven mittels der Zentralstrahlkapillare Variationskoeffizienten von rund 13 % gefunden, als er native Humanerythrozyten untersuchte. Die Differenz zwischen den in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen und den von Kachel gefundenen Ergebnissen kann nicht erklärt werden. Mögliche Ursachen können die unterschiedliche apparative Ausstattung sowie unterschiedliche Eichproben sein.

Auf diese Weise tritt einmal mehr die Tatsache in den Vordergrund, daß man Normwerte oft nur miteinander vergleichen kann, wenn sie auf denselben Bestimmungsmethoden beruhen. Bei der quantitativen Betrachtung der Anisozytose scheint dies besonders wichtig zu sein.

1.2 Normwertbereiche

Der Normwertbereich für einen bestimmten Parameter erhält man definitionsgemäß, indem man die statistische Spanne von $\bar{x} \pm 2s$ des entsprechenden Testkollektivs angibt. Für die ausgewertete Gesamtgruppe von Tab. 1 (S. 38) ergeben sich als Normwertbereiche

- a) für das MCV $78,6 - 101,4 \mu m^3$,
- b) für die absolute Anisozytose (An_{abs}) $50,9 - 72,9 \mu m^3$,
- c) für die relative Anisozytose (An_{rel}) $1,81 - 2,29$.

Damit einfachere Anhaltspunkte zur Verfügung stehen, kann man sich bei der Festlegung dieser "Normalbereiche" auf folgende Zahlen festlegen:

a)	MCV	:	80	-	100	μm^3
b)	An_{abs}	:	50	-	70	μm^3
c)	An_{rel}	:	1,80	-	2,30	

In diesem Zusammenhang ist es weiterhin von einigem Interesse, inwieweit die Werte bei gesunden Personen über mehrere Tage hin schwanken. Zu diesem Zweck wurden bei fünf Testprobanden an 5 aufeinander folgenden Tagen Blutproben entnommen und Verteilungskurven angefertigt. Beim MCV lag die Standardabweichung der gewonnenen Werte bei allen Personen unter $1 \mu\text{m}^3$, bei der absoluten Anisozytose betrug das mittlere $s 1,8 \mu\text{m}^3$. Im Hinblick auf die Meßgenauigkeit darf man annehmen, daß sich die EEV-Verteilungskurven bei Gesunden zumindest über kürzere Zeiträume hinweg nicht wesentlich verändern.

Weitere Fragestellungen betreffen die möglichen Faktoren, die für die Verschiebungen der Volumenverteilungskurven verantwortlich sind. Die kausalen Zusammenhänge sind noch ungeklärt. Dafür sind viele Parameter bekannt, bei deren Änderung auch eine Verschiebung des MCV beobachtet werden kann. Ohne auf Vollständigkeit Anspruch erheben zu können, sollen jedoch die wichtigsten dieser Faktoren angeführt werden; es sind dies

Vit B₁₂

Folsäure (quantitativ als Serum-Folat-Spiegel)

Eisen (quantitativ als Serum-Fe)

Hb_E

Hypoxie

Bei größeren Veränderungen (23) jeder dieser Parameter nimmt auch das MCV einen anderen Wert an. Für den multifaktoriellen Zusammenhang spricht weiterhin die Beobachtung, daß keine durchgehende lineare oder anderweitig proportionale Beziehung zwischen dem MCV und einem einzelnen der erwähnten Parameter besteht. Zur Anschauung sollen einige weniger bekannte Beispiele kurz vorgestellt werden.

Wu (43) fand bei 89 % von 63 Patienten mit chronischem Alkoholismus (> 80 g Alkohol/die) eine Makrozytose der roten Blutzellen, allgemein nicht mit Anämie verbunden.

Die Serum-Folat-Werte waren etwa bei einem Drittel der Patienten reduziert (auch die Folat-Werte der Erythrozyten und der Leber). Die Makrozytose verschwand allein bei Alkoholentzug, aber blieb, trotz Folsäuresubstitution, wenn die Alkoholzufuhr nicht beschränkt wurde. Die Makrozytose scheint, wie Wu folgert, auf einem direkten Einfluß des Alkohols auf die Erythroblastenentwicklung zu beruhen.

Auf der anderen Seite weiß man, daß nach Zufuhr der meisten Antiepileptika der Gehalt

an Folsäure im Serum vermindert ist. Dieser Mangel kann zu Megaloblastenanämien führen, die aber durch Gabe von Folsäure behoben werden können.

Okuno (29) stellt als Ursache, daß ältere Probanden häufiger ein höheres MCV besitzen, zur Diskussion, daß in diesen Gruppen mehr Personen unter chronischer Hypoxie leiden als in den Gruppen jüngeren Alters. Auch eine Raucheranamnese könnte eine gewisse Rolle spielen (29).

2. HÄMATOLOGISCHE ERKRANKUNGEN

2.1 M. Hodgkin

Wenn man die Ergebnisse analysieren will, bietet es sich als vorteilhaft an, die Parameter, welche die EEV-Verteilungskurven charakterisieren, größtmäßig zu den Normwertbereichen in Beziehung zu setzen. In der Tabelle 12 ist dies geschehen, wobei zwei Gesichtspunkte herangezogen wurden. Einmal sind Werte, die innerhalb ihres Normwertbereiches liegen, als "normal" bezeichnet, liegen sie unterhalb oder oberhalb davon, sind sie in den Spalten unter "klein" bzw. "groß" eingetragen. Gemäß einer zweiten Art der Aufteilung sind Werte der Bezeichnung "normal" zugeordnet, wenn sie zwischen zwei Grenzwerten liegen, die einen engeren Bereich definieren, welcher ungefähr ± 1 s entspricht. Auf diese Weise kann man die Verhältnisse besser mit Ergebnissen einer Untersuchung von Kallee und Mitarb. (23) vergleichen. Diese haben 10 Fälle von CML untersucht, indem sie einen Coulter Counter (Modell A) und, daran angeschlossen, einen Vielkanal-Impulshöhenanalysator (Victoreen SCIPP 1600) benützten, wobei sie nur rechtsschiefe Verteilungskurven gewinnen konnten. Kurven, deren Maximum um $> 1,5$ Kanäle von dem eines Testblutes abwich, bezeichneten sie als "kleines" bzw. als "großes" Erythrozytenvolumen.

Entsprechend der Normwertbereichsdefinition hat nur einer von den 10 Hodgkin-Patienten ein "großes" MCV, während bei den restlichen neun die Erythrozytenvolumina als "normal" bezeichnet werden müssen. Die Tatsache, daß das MCV der meisten im oberen Normwertbereich liegt, kommt besser durch den Gruppen-Mittelwert ($95 \mu\text{m}^3$) zum Ausdruck. Statistisch findet sich kein signifikanter Unterschied bei der Größe des MCV zwischen Normalpersonen und Patienten mit M. Hodgkin (Tab. 15, S. 64).

Bei 7 Fällen fällt die absolute Anisozytose unter die Klassifizierung "groß", bei den übr-

gen drei finden sich die Werte unter "normal". Auch bei statistischer Betrachtungsweise sind die Unterschiede signifikant (s. Tab. 15, S. 64). In der Tab. 12 ist auch die entsprechende Aufsplitterung dargestellt, bei der der Bereich von "normal" enger gefaßt ist (s.o.).

Tabelle 12: Hämatologische Erkrankungen: Aufstellung und Vergleich von Ergebnissen unter verschiedenen Gesichtspunkten

k = klein, n = normal, g = groß, N = Größe d. Kollektivs

a : "normal" $\hat{=}$ Normwertbereich

b : "normal" $\hat{=}$ beim MCV:

Maximum der Kurven weicht nicht mehr als $+1,5$ Kanäle von dem des Testblutes, das Kallee benützt, ab (bei den Ergebnissen von Kallee)

$\hat{=}$ ungefähr $+1$ s ($+5 \mu\text{m}^3$) des Normwertbereiches von a (bei den eigenen Ergebnissen als Vergleichsmaßstab verwendet)

bei An_{abs} : $56 - 68 \mu\text{m}^3$

bei An_{rel} : $1,93 - 2,17$

Gruppe	Definition für "normal"	N	MCV			An_{abs}			An_{rel}		
			k	n	g	k	n	g	k	n	g
M. Hodgkin	eig. Unt. (a)	10	0	9	1	0	3	7	0	5	5
	eig. Unt. (b)	10	0	7	3	0	3	7	0	2	8
chron. myel. Leukämie	Kallee (b) (23)	10	4	5	1	-	-	-	-	-	-
	eig. Unt. (a)	8	0	6	2	0	3	5	0	3	5
	eig. Unt. (b)	8	3	3	2	0	2	6	0	1	7

2.2 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Der Mittelwert des MCV der acht untersuchten Leukämie-Patienten beträgt $90 \mu\text{m}^3$. Dabei geht in keiner Weise hervor, daß bei zwei Fällen das MCV oberhalb des Normwertbereiches liegt (s. Tab. 12). Fünf Personen dieses Krankengutes zeigen hohe Anisozytose-Werte. Statistisch gesehen bestehen bezüglich des MCV keine, in bezug auf An_{abs} und An_{rel} jedoch eindeutige signifikante Veränderungen gegenüber der "Normalgruppe" (s. Tab. 15).

Man kann die Ergebnisse von Kallee u. Mitarb. (23) nicht vorbehaltlos mit den eigenen vergleichen, da den von Kallee angegebenen Kanälen keine genauen absoluten Werte in μm^3 zugeordnet werden können. Die Aufteilung der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse gemäß einem enger gefaßten Bereich, der ungefähr ± 1 s entspricht (s. Tab. 12), kommt der Klassifizierung von Kallee am nächsten. Bei dieser Darstellung ergeben sich ähnliche Ergebnisse bei beiden CML-Kollektiven. Auf Grund der zahlenmäßig geringen Besetzung dieser Krankheitsgruppen können kaum statistische Folgerungen gezogen werden.

2.3 Bedeutung der relativen Anisozytose (An_{rel}) und Mischverteilungen

Hier soll auf die Bedeutung der relativen Anisozytose bei der Untersuchung von pathologischem Probenmaterial eingegangen werden.

Die EEV-Verteilungskurven von Normblut sind normal verteilt (21, 22, 35, 36, 37). Der Streubereich der An_{rel} bewegt sich dabei zwischen 1,80 und 2,30. Unter Berücksichtigung der noch vorhandenen leichten Rechtsschiefe der Verteilungskurven infolge der nicht ganz vollständigen Korrektur durch das elektronische Impulserkennungsverfahren des Channelyzers ist es möglich, mit einem Blick auf das Aussehen der EEV-Verteilungskurven von kranken Personen festzustellen, ob eine Normalkurve oder eine deutliche Asymmetrie vorliegt. Bei Fällen letzterer Art muß das Vorliegen von Mischverteilungen angenommen werden. Vereinzelt ist eine Zuordnung der Verteilungskurven zu einer der beiden Gruppen nicht eindeutig möglich.

Bei 115 Blutproben, die von 170 Hämatologie- und Leberpatienten stammten, bewegte sich die An_{rel} im Normbereich (d.h. $< 2,30$), und es fand sich darunter keine einzige Mischverteilung. Bei den restlichen 55 Fällen lag die relative Anisozytose über 2,30. Davon konnten 33 als eindeutige Mischverteilungen identifiziert werden, 10 Proben waren unbestimmbar, die restlichen 12 Proben waren normal verteilt. In Tab. 13 sind diese Befunde zusammengefaßt.

Tabelle 13: Visuelle Beurteilung von EEV-Verteilungskurven bei Leber- und hämatologischen Krankheiten
MV = Mischverteilung

	Gesamtzahl der Fälle	Beurteilung von Verteilungskurven durch Blickdiagnose		
		keine MV	fragliche MV	eindeutige MV
$An_{rel} < 2,3$	115	115	0	0
$An_{rel} > 2,3$	55	12	10	33

Für das Volumen der Einzelerthrozyten in der peripheren Blutbahn sind zahlreiche Faktoren verantwortlich. Der Größe dieses Volumens kommt eine biologische Streuung zu, die quantitativ durch die Anisozytose-Werte erfaßt wird. Die natürliche Variationsbreite dieser Volumensstreuung bei Blutgesunden wird durch den Normbereich der Anisozytose veranschaulicht.

Zwischen dem Absolutwert des MCV und der Größe der Streuung scheint hierbei eine Beziehung zu bestehen. Die Verhältnisse bei größeren Abweichungen des MCV vom Normbereich lassen eine direkte Proportionalität zwischen den beiden Parametern vermuten. Die relative Anisozytose stellt dabei ein Maß für den Proportionalitätsfaktor dar, unter der Voraussetzung, daß Gaußsche Verteilungen vorliegen. Solange keine Mischverteilungen beobachtet werden, bleibt die An_{rel} auch bei makrozytären und mikrozytären Anämien innerhalb des Normbereiches.

Für das Entstehen von Mischverteilungen kommen grundsätzlich zwei Möglichkeiten in Betracht:

- Ein Patient erhält z.B. Transfusionen mit Fremderythrozyten. Weicht die EEV-Verteilungskurve des Erkrankten von der des Transfusionsblutes ab, so überlagern sich beide Gaußverteilungen, und die Verteilungskurve des betreffenden Patienten verliert ihre Symmetrie.
- Im Verlauf einer Erkrankung ändern sich die hämatologischen Parameter und ebenso weitere Faktoren, welche das Erythrozytenvolumen bestimmen. Für jeden Zeitpunkt der Krankheit existiert dann eine Verteilungskurve mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Anisozytose, die den jeweils vorherrschenden Verhältnissen entspricht. Man kann sich somit unendlich viele EEV-Verteilungskurven vorstellen, die interferieren und die

schiefe Gesamtverteilung verursachen. Für die Streuung oder Breite einer solchen Mischverteilung ist die Geschwindigkeit der stetigen Weiterentwicklung der auf die Erythrozytengröße Einfluß nehmenden Faktoren verantwortlich, wobei die Lebensdauer der roten Blutkörperchen den limitierenden Faktor darstellt.

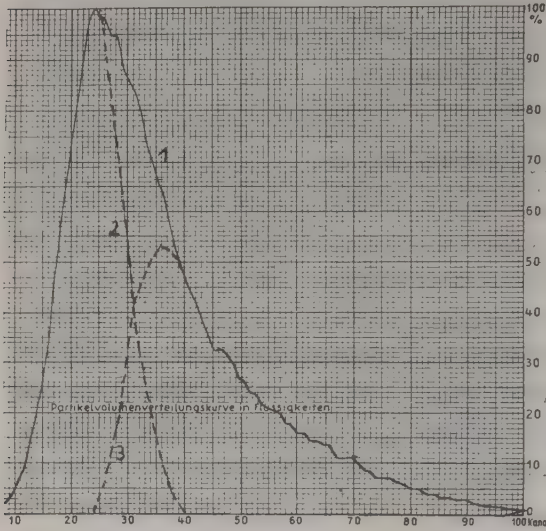
Zur Veranschaulichung zeigt die Abb. 11 auf S. 60 zwei EEV-Verteilungskurven eines 69jährigen Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, welcher in der Tab. 7 (S. 45) unter der Nr. 6 aufgeführt ist. Kurve 1 in a ist die stark asymmetrische Gesamtverteilung. Man kann nun diese Kurve analysieren, indem man zunächst annimmt, daß der linke, zum Gipfel führende Kurvenast einer Einzelverteilung entspricht, welche die vorliegenden Verhältnisse repräsentiert, die scheinbar zu diesem Zeitpunkt einigermaßen konstant blieben. Entsprechend einer Methode nach Gutmann (18) wird eine Symmetrieachse festgelegt, die durch den Kurvengipfel verläuft, und an der der linke Verteilungsschenkel gespiegelt wird. So entsteht Kurve 2. Für jeden Kanal wird dann die Differenz zwischen Kurve 1 und 2 ermittelt und eingezeichnet, wodurch Kurve 3 entsteht.

Die Verteilung 3 ist wiederum aus zahlreichen Einzelverteilungen zusammengesetzt. Dieses Verfahren der Zerlegung einer Verteilungskurve trifft die Wirklichkeit nur sehr unscharf. Allein die An_{rel} von 2 mit einem Wert von ca. 2,8 läßt die Vermutung zu, daß auch die Kurve 2 noch eine Mischverteilung darstellt. Die Wahl der Symmetrieachse, die zur Ermittlung von 2 führte, erfolgte schließlich auch recht willkürlich unter der Annahme, der linke aufsteigende Schenkel von Kurve 1 in Abb. 11 a würde einer normalen Einzelverteilung entsprechen. Weiterhin konnte die vorhandene leichte artefizielle Rechtschiefe der Gesamtverteilung nicht berücksichtigt werden. Trotzdem ist diese Methode der Kurvenanalyse recht brauchbar.

Da jener Patient unter hochgradiger Anämie litt, erhielt er an zwei aufeinander folgenden Tagen insgesamt 750 ml Erythrozytenkonzentrat-Transfusionen. Abb. 11 b veranschaulicht die dadurch bewirkte Veränderung im Aussehen der EEV-Verteilungskurve (1). Der Gipfel hat sich in den Normalbereich verschoben. Die pathologische Teilpopulation 2 macht jetzt gegenüber der stark von den Erythrozyten-Transfusionen beeinflussten Verteilung 3 den kleineren Anteil aus. Die erzielte Verbesserung im Blutbild kann man auch aus den anderen hämatologischen Werten ersehen, die neben der Abbildung aufgeführt sind.

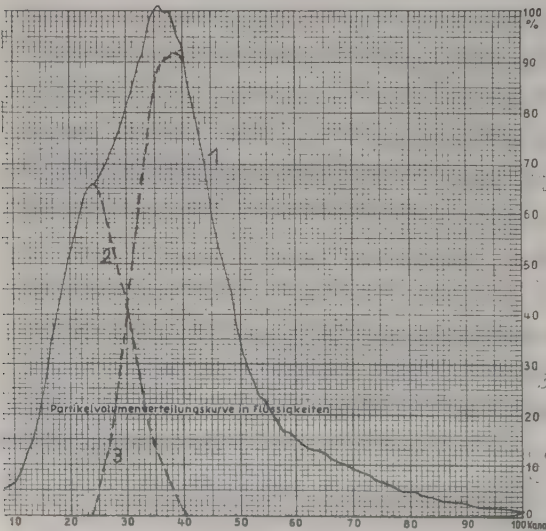
Die Tatsache, daß auch bei einer $An_{rel} > 2,30$ einige Kurven festgestellt wurden, die visuell nicht zu den Mischverteilungen gerechnet wurden, kann damit erklärt werden, daß sich in solchen Fällen Einzelverteilungen überlagern, die sehr nahe beieinander lie-

gen und bei quantitativer Ausgeglichenheit keine Asymmetrie erzeugen (s. Tab. 13, S.58).



a) vor der Ery-Konzentratgabe:

Hkt: 25 Vol%
 Ery: 2,8 Mill/ μ l
 Hb: 7,6 g%
 Hb_E: 27,1 pg
 Retikulocyten: 23 %
 Leuko: 16 500/ μ l



b) nach der Ery-Konzentratgabe:

Hkt: 35 Vol%
 Ery: 3,8 Mill/ μ l
 Hb: 11,1 g%
 Hb_E: 29,3 pg
 Retikulocyten: 7 %
 Leuko: 19 600/ μ l

Abb. 11: Zerlegung einer Mischverteilung in zwei Kurven
 69-jähriger Patient mit CML

3. LEBERERKRANKUNGEN

3.1 Hepatitis

Zur Diskussion der Verteilungskurven sind auch bei den Lebererkrankungen die gleichen Gesichtspunkte herangezogen worden wie bei den hämatologischen Fällen.

Der Durchschnittswert des MCV aller Hepatitis-Patienten ($91,6 \mu\text{m}^3$) liegt im Normbereich. Nur bei 8 der 59 Erkrankten findet sich dieser Parameter außerhalb des Normbereiches (s. Tab. 14, S. 62). Die Abweichungen sind statistisch nicht signifikant, wenn man die Hepatitis-Gruppe als Ganzes betrachtet.

Anders verhält es sich bei der Anisozytose. Ihr Absolutwert ist bei 22 Patienten "groß", relativ gesehen nur bei 12; bei letzteren könnte es sich also um Mischverteilungen handeln. Im Gegensatz zur relativen Anisozytose erweisen sich die Veränderungen der An_{abs} als statistisch signifikant.

Bezüglich des Volumens liegt auch eine entsprechende Studie von Kallee (23) vor. Zum Vergleich ist in der Tab. 14 die entsprechende Aufstellung der eigenen Ergebnisse mit Verwendung des "verengten Normalbereiches" als Maßstab (s. Kap. 2.1, S. 55) hinzugefügt. Eine grobe Übereinstimmung ist zu erkennen.

3.2 Lebercirrhose

Hier liegt das MCV bei 23 der 33 untersuchten Fälle im Normbereich, immerhin jedoch bei 7 Patienten über $100 \mu\text{m}^3$ und bei 11 über $95 \mu\text{m}^3$. Der prozentuale Anteil der Fälle, bei denen eine vergrößerte Anisozytose vorliegt, ist bei den Patienten mit Cirrhose höher als bei denen mit Hepatitis. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß eine ausgeprägte Cirrhose im Gegensatz zur Hepatitis mit einem extremen Anisozytose-Anstieg verbunden sein kann (bis $120 \mu\text{m}^3$), wobei die An_{rel} dann jedoch im Verhältnis zum Absolutwert nicht so stark erhöht ist, da solche Fälle mit einer Makrozytose einhergehen. So finden sich MCV und An_{rel} bei statistischer Betrachtungsweise im Verhältnis zum Normbereich nicht signifikant verschieden. Bei der An_{abs} sind die Unterschiede jedoch relevant, und die Signifikanz ist auch höher als bei der Hepatitis-Gruppe einzustufen (s. Tab. 15, S. 64).

In der Vergleichsgruppe, die Kallee (23) untersucht hat, sind auch Metastasenlebern miteinbezogen. Gegenüber der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Studie findet er in seinem Testkollektiv einen höheren Prozentsatz an Fällen mit Makrozytose. Dafür kön-

nen unterschiedlich weit fortgeschrittene Leberumbauprozesse bei den Patienten in den beiden Gruppen verantwortlich sein oder Sekundärerkrankungen, da Kallee sein Patientengut nach denjenigen Hauptdiagnosen sortierte, von denen er annahm, daß sie für die Messung der EEV-Verteilungen am wichtigsten seien.

Tabelle 14: Lebererkrankungen: Eigene Untersuchungen und Befunde der Literatur (MCV und Anisozytose)

N = Größe des Kollektivs

- a: "normal" $\hat{=}$ Normwertbereich
 b: "normales" Volumen (MCV): Maximum der Kurven weicht nicht mehr als $\pm 1,5$ Kantile von dem des Testblutes, das Kallee benützte, ab (bei den Ergebnissen von Kallee)
 $\hat{=}$ ungefähr $\pm 1 s$ ($\pm 5 \mu m^3$) des Normwertbereiches von a (bei den eigenen Ergebnissen als Vergleichsmaßstab verwendet)

Kollektiv		Definition für "normal"	N	Volumen (MCV)		
				klein	normal	groß
Hepatitis	Kallee (23)	b	18	6 = 33 %	9 = 50 %	3 = 17 %
	eigene E.	b	59	7 = 12 %	37 = 63 %	15 = 25 %
	eigene E.	a	59	3 = 5 %	51 = 86 %	5 = 9 %
Cirrh. u. Metastasenlebern: Kallee (23)		b	33	5 = 15 %	12 = 36 %	16 = 49 %
Cirrh.	eigene E.	b	33	3 = 9 %	19 = 58 %	11 = 33 %
	eigene E.	a	33	3 = 9 %	23 = 69 %	7 = 22 %

Kollektiv	Definition für "normal"	N	An _{abs}			An _{rel}		
			klein	normal	groß	klein	normal	groß
Hepatitis: eigene E.	a	59	0	37 =63 %	22 =37 %	0	47 =80 %	12 =20 %
Cirrhose: eigene E.	a	33	0	19 =58 %	14 =42 %	0	22 =67 %	11 =33 %

4. ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDE DER EINZELNEN KRANKHEITSGRUPPEN IN IHRER GESAMTHEIT GEGENÜBER DEM NORMWERTKOLLEKTIV UND UNTEREINANDER IM HINBLICK AUF STATISTISCHE SIGNIFIKANZ

Die Tab. 15 gibt eine Übersicht, inwieweit sich die einzelnen Krankheitsgruppen voneinander und insbesondere gegenüber dem Normwertkollektiv statistisch signifikant unterscheiden. Es sind neben den die Verteilungskurven charakterisierenden Parametern vollständigshalber auch noch die übrigen hämatologischen Werte berücksichtigt. Die Beurteilung erfolgt nach drei Stufen. Finden sich keine signifikanten Differenzen, so ist dies mit "n.s." (nicht signifikant) gekennzeichnet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ (s. S. 35/36) sind mit "+" versehen. Die dritte Bewertungsstufe geht über die auf medizinisch-biologischem Gebiet geforderte Vertrauenswahrscheinlichkeit (0,95) hinaus; hierbei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 0,01$. Solche Fälle sind mit "++" hervorgehoben.

Bezüglich des MCV sind überhaupt keine signifikanten Abweichungen festzustellen. Dagegen sind die Differenzen der An_{abs} der vier untersuchten Krankheitsgruppen gegenüber den Normwerten nach statistischen Grundsätzen gesichert. Bei der An_{rel} ergeben sich außer bei der CML-Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 15: Übersicht über die Signifikanz der Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven

n.s. = nicht signifikant

+ = statistisch signifikant mit $P \leq 0,05$

++ = statistisch signifikant mit $P \leq 0,01$

		Normale	Hodgkin	CML	Hepatitis
Hodgkin	Ery	++			
	Hkt	k. Ang.			
	Hb	++			
	Hb _E	n.s.			
	Leu	n.s.			
	MCV	n.s.			
	An _{abs}	++			
	An _{rel}	n.s.			
CML	Ery	++	+		
	Hkt	++	k. Ang.		
	Hb	++	+		
	Hb _E	n.s.	n.s.		
	Leu	++	++		
	MCV	n.s.	n.s.		
	An _{abs}	++	n.s.		
	An _{rel}	++	++		
Hepatitis	Ery	n.s.	++	++	
	Hkt	n.s.	k. Ang.	++	
	Hb	n.s.	++	++	
	Hb _E	n.s.	n.s.	n.s.	
	Leu	n.s.	n.s.	++	
	MCV	n.s.	n.s.	n.s.	
	An _{abs}	+	n.s.	++	
	An _{rel}	n.s.	n.s.	++	
Cirrhose	Ery	+	+	++	n.s.
	Hkt	n.s.	k. Ang.	++	n.s.
	Hb	++	++	++	n.s.
	Hb _E	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Leu	n.s.	n.s.	++	n.s.
	MCV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	An _{abs}	++	n.s.	++	n.s.
	An _{rel}	n.s.	n.s.	++	n.s.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erstellung von EEV-Verteilungskurven wird als genauere und bequemer bzw. schneller durchzuführende Alternative zu den klassischen Price-Jones-Kurven vorgestellt. Die physikalischen Grundlagen des elektronischen Meßverfahrens nach Coulter werden erläutert, und die prinzipielle Arbeitsweise der Geräte wird dargelegt. Auf die zahlreichen damit verbundenen Fehlerquellen wird im einzelnen eingegangen, da die entsprechenden Korrekturmethode für das Aussehen der erhaltenen Verteilungskurven von entscheidender Bedeutung sind.

Der Beschreibung dieser Kurven dienen drei Parameter: das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) und zur Charakterisierung der Breite der Verteilungsspektren die absolute und die relative Anisozytose (An_{abs} bzw. An_{rel}).

Auf diese Weise werden die Blutproben verschiedener Personenkollektive untersucht.

Die Normwertgruppe, die aus gleich viel Männern und Frauen zusammengesetzt ist, zeigt, daß unter den zugrunde gelegten Voraussetzungen das MCV zwischen 80 und 100 μm^3 , und daß die An_{abs} und die An_{rel} sich etwa innerhalb 50 und 70 μm^3 bzw. 1,80 und 2,30 bewegen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren finden sich hier keine Geschlechtsunterschiede, eine z.T. propagierte Abhängigkeit von Alter und MCV läßt sich nicht signifikant bestätigen.

Die beiden Kollektive mit Hodgkin- und CML-Patienten liefern bezüglich des MCV in den meisten Fällen keine Abweichungen vom Normbereich. Dem hingegen sind die EEV-Verteilungskurven häufig verbreitert, was besonders bei der CML-Gruppe in den Anisozytose-Werten zum Ausdruck kommt.

Die MCV-Mittelwerte der Hepatitis- und der Cirrhose-Gruppe erbringen zwar auch keine relevanten Differenzen gegenüber den "Normalen", jedoch ist der Prozentsatz der Fälle mit Makrozytosen bei den Patienten, deren Lebern Umbauvorgänge aufweisen, höher als bei denen ohne dergleichen Erscheinungen. Bei Betrachtung der Anisozytose sind die Veränderungen ausgeprägter. Auch in diesem Falle zeigen die Verteilungskurven der Cirrhose-Patienten häufiger vergrößerte Anisozytose-Werte, und die Signifikanz ist höher einzustufen.

Im Zusammenhang mit der Analyse der einzelnen pathologischen Kollektive wird die unterschiedliche Bedeutung von absoluter und relativer Anisozytose erklärt. Die Gaußschen Einzelverteilungen werden den Mischverteilungen gegenübergestellt, wobei sich die

An_{rel} als recht brauchbare Differenzierungsmethode erweist.

Weiterhin werden Überlegungen im Hinblick auf das Zustandekommen der Mischverteilungen aufgeführt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) BECKER, HJ. u.
J. HOLLENDER Die Volumenverteilungskurve der Erythrocyten in der klinischen Diagnostik.
Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med. 73, 419-23, München 1967
- 2) BECKER, HJ. u.
J.P. KALTWASSER Die Volumenverteilungskurve der Erythrocyten in der hämatologischen Diagnostik.
Deutsche Med. Wschr. 93, 1514-23, Stuttgart 1968
- 3) V. BOROVICZÉNY, K.G. Erfahrungen mit Blutkörperchenzählapparaten.
Ärztl. Laboratorium 8, 161-178, Berlin 1962
- 4) BRECHER, G.,
E.F. JAKOBKE,
M.A. SCHNEIDERMAN,
G.Z. WILLIAMS,
P.J. SCHMIDT Size distribution of erythrocytes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, 242 (1962)
- 5) BUERKER, K. Eine neue Form der Zählkammer.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 107, 426, Berlin 1905
- 6) BULL, B.S. On the distribution of red cell volumes.
Blood 31, 503, Baltimore 1968
- 7) COLLIER, H.B. Some problems in the use of the Coulter Counter for erythrocyte total counts and volume distribution.
J. Clin. Path. 21: 179-82, London 1968
- 8) COULTER DIAGNOSTICS: Assay Sheet for 4 C^R
Beiblatt der einzelnen Kontrollblutchargen.
- 9) COULTER, W.H. A high speed automatic blood cell counter and cell size analyzer
Nat. Electron. Conf. 3, 10, Chicago 1956
- 10) COULTER, W.H. Deutsche Patentschrift No. 96 48 10, Kl. 421, Gr. 304 (1957)
- 11) CRAINE, K. et al. Red cell volume distribution histograms for establishing the normal range using the Coulter plotter model J
J. Clin. Path. 20: 913-5, London 1967
- 12) VAN DILLA, M.,
N.J. BASMAN,
M.J. FULWYLER Los Alamos Scientific Laboratory Report
L.A. 31, 03 (1964)
- 13) ENGLAND, J.M.,
M.C. DOWN Red-cell-volume distribution curves and the measurement of anisocytosis
The Lancet 1: 701, London 1974

- 14) GEIGY A.G. Statistik innerhalb der Documenta Geigy, Wissensch. Tabellen, S. 146-71, Basel 1960
- 15) GÜNTHER, H. Die klinische Bedeutung der Größenbestimmung der Erythrocyten.
Dtsch. Archiv f. klin. Med. 161, 18 (1928)
- 16) GÜNTHER, H.
Dtsch. Archiv f. klin. Med. 162, 215 (1929)
- 17) GÜNTHER, H. Formproblem an menschlichen Erythrocyten
Fol. haemat. 35, 383, Leipzig 1928
- 18) GUTMANN, J. Elektronische Verfahren zur Ermittlung statistischer Maßzahlen einiger medizinisch wichtiger Daten.
Elektromedizin 11, 62-79, Berlin 1966
- 19) HERNBERG, C.A. Die Größe und Form der roten Blutkörperchen bei Menschen verschiedenen Alters unter physiologischen Verhältnissen.
Acta med. Scand. Suppl. 122, Stockholm 1941
- 20) JAKOBI, H.,
A. HANSTEIN,
W. HANSTEIN,
W. KÜNZLER Erfahrungen mit einem elektronischen Erythrocytenzählgerät bei Zählungen und Volumenverteilungskurven.
Klin. Wschr. 45, 154, Berlin 1967
- 21) KACHEL, V. Methoden zur Analyse und Korrektur apparativ bedingter Meßfehler beim elektronischen Verfahren zur Teilchengrößenbestimmung nach Coulter.
Dissertation TU Berlin (1972)
- 22) KACHEL, V.,
H. METZGER u.
G. RUHENSTROTH-BAUER Der Einfluß der Partikeldurchtrittsbahn auf die Volumenverteilungskurven nach dem Coulter-Verfahren.
Z. ges. exp. Med. 153, 331, Berlin 1970
- 23) KALLEE, E. u.
E. WECHSELBERGER Volume distribution curves and mean diameters of erythrocytes in various diseases.
Ärztl. Forsch. 25, 381-95, München 1971
- 24) LIEBERHERR, W. Zur Methodik der Erythrocytenmessungen.
Klin. Wschr. 16, 17, Berlin 1937
- 25) LUSHBAUGH, C.C.,
N.J. BASMANN,
B. GLASCOCK Electronic measurement of cellular volumes II. Frequency distribution of erythrocyte volumes.
Blood 20, 241, Baltimore 1962
- 26) METZGER, H. et al. The calibration by electronic means of Coulter Counter for the determination of absolute volume of particles.
Blut 25, 179-84, München 1972

- 27) METZGER, H.,
V. KACHEL,
G. RUHENSTROTH-BAUER
Einfluß von Partikelgröße, -Form und -Konsistenz
auf rechtsschiefe Coulter-Volumenverteilungs-
kurven.
Blut 23, 143, München 1971
- 28) OKUNO, T.
Red cell size and age.
Br. Med. J. 1: 569-70, London 1972
- 29) OKUNO, T.
Red cell size as measured by the Coulter model S.
J. Clin. Path. 25, 599-602, London 1972
- 30) PRICE-JONES, C.
Red Blood Cell Diameter.
London 1933
- 31) PRICE-JONES, C.
J. of Path. 32, 479, London 1929
- 32) REIMANN, F. u.
S. STRANCALI
Kritische und methodische Bemerkungen zur Be-
stimmung der Größe und Form der Erythrocyten.
Blut 6, 151-72, München 1960
- 33) RUHENSTROTH-BAUER, G. u.
D. ZANG
Automatische Zählmethoden: Das Coultersche
Partikelzählgerät.
Blut 6, 446, München 1960
- 34) SILVER, H., and
S. FRANKEL
Normal values for mean corpuscular volume as
determined by the model S Coulter Counter.
Amer. J. Clin. Path. 55, 438, Baltimore 1971
- 35) THOM, R.,
A. HAMPE u.
G. SAUERBREY
Die elektronische Volumenbestimmung von Blut-
körperchen und ihre Fehlerquellen.
Z. ges. exp. Med. 151, 331, Berlin 1969
- 36) THOM, R. et al.
Erythrocytenvolumen-Verteilungskurven in der
hämatologischen Diagnostik.
Deutsche Med. Wschr. 94: 617/8, Stuttgart 1969
- 37) THOM, R.,
V. KACHEL
Fortschritte für die elektronische Größenbestim-
mung von Blutkörperchen.
Blut 21, 48, München 1970
- 38) VIERODT, K.
Neue Methode der quantitativen mikroskopischen
Analyse des Blutes.
Arch. Phys. Heilk. 11, 26, Stuttgart 1852
- 39) VIERODT, K.
Untersuchungen über die Fehlerquellen bei der
Zählung von Blutkörperchen.
Arch. Phys. Heilk. 11, 854, Stuttgart 1852
- 40) VIERODT, K.
Zählungen der Blutkörperchen des Menschen.
Arch. Phys. Heilk. 11, 327, Stuttgart 1852
- 41) WECHSELBERGER, E.
Apparative Volumenverteilungs-Analyse von
Blutzellen.
Blut 20, 112-24, München 1970

- 42) WEED, R.I.,
A.J. BOWDLER

The influence of hemoglobin concentration on
the distribution pattern of the volume of human
erythrocytes.

Blood 29, 297, Baltimore 1967

- 43) WU, A. et al.

Macrocytosis of Chronic Alcoholism.

The Lancet 1: 829, London 1974

Herrn Prof. Dr. med. W. Prellwitz möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas herzlichst danken.

Herrn Dr. med. S. Kapp gilt mein Dank für stete Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung in die Methodik und bei der Durchführung der labortechnischen Untersuchungen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse danke ich ganz besonders Frau Dipl.-Math. D. Müller.

LEBENS LAUF

Am 14. Juni 1951 wurde ich in Pforzheim als Sohn des prakt. Arztes Dr. Karl Storck und dessen Frau Irma, geb. Münster, geboren.

Dort besuchte ich ab dem Frühjahr 1958 vier Jahre die Volksschule. Nach bestandener Aufnahmeprüfung wechselte ich im Mai des Jahres 1962 in das humanistische Reuchlin-Gymnasium in Pforzheim über. Nach neun Schuljahren erlangte ich im Sommer 1970 das Reifezeugnis.

Hierauf bewarb ich mich erfolgreich um einen Studienplatz in Medizin und erhielt eine Zulassung von der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz für das WS 1970/71.

Nach zwei Semestern absolvierte ich das Vorphysikum und bestand im Sommer 1973 die ärztliche Vorprüfung. Die sechs klinischen Semester leistete ich ebenfalls in Mainz ab und erwarb im Herbst des Jahres 1976 das Staatsexamen.

